

# UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina de Lisboa



## **Epidemiologia molecular e estudo dos determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Klebsiella* spp.**

Cátia Sofia Gabriel Caneiras

Orientador: Prof. Doutora Maria Aida da Costa e Silva da Conceição Duarte

Co-orientador: Prof. Doutor José Augusto Gamito Melo Cristino

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Ciências e Tecnologias da Saúde, especialidade em Microbiologia

2019



# UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina de Lisboa



## **Epidemiologia molecular e estudo dos determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Klebsiella* spp.**

Cátia Sofia Gabriel Caneiras

Orientador: Prof. Doutora Maria Aida da Costa e Silva da Conceição Duarte

Co-orientador: Prof. Doutor José Augusto Gamito Melo Cristino

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Ciências e Tecnologias da Saúde, Especialidade em Microbiologia

Júri:

Presidente: Doutor João Eurico Cortez Cabral da Fonseca, Professor Catedrático e Vice-Presidente do Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Vogais:

- Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.
- Doutora Maria José Félix Saavedra, Professora Associada com Agregação da Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade de Trás os Montes e Alto Douro.
- Doutora Maria Aida da Costa e Silva da Conceição Duarte, Professora Associada com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (*Orientadora*).
- Doutora Maria Isabel Nobre Portugal Dias Jordão, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.
- Doutor Mário Nuno Ramos de Almeida Ramirez, Professor Associado com Agregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.
- Doutor Thomas Hanscheid, Professor Auxiliar com Agregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Instituições Financiadoras: Associação para o Desenvolvimento do Ensino e Investigação em Microbiologia (ADEIM), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa



**As opiniões expressas nesta publicação são da exclusiva responsabilidade do seu autor.**



**A impressão desta Tese foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa em reunião de 19 de Junho de 2018.**





A autora foi a principal responsável pelo trabalho apresentado em todos os Estudos da Tese, nomeadamente no desenho dos estudos, metodologia, execução do trabalho laboratorial, análise formal dos dados, discussão de resultados, conclusão e escrita dos artigos científicos. O trabalho laboratorial apresentado na presente Tese foi realizado no Laboratório de Investigação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nela apresentados.



## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Produção e actividade científica resultante da Tese.....</b>                          | <b>15</b> |
| A. Bolsas, Prémios e Distinções (4).....   | 15        |
| B. Publicações Científicas (16).....   | 16        |
| B.1. Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica (2) ..... | 16        |
| B.2. Artigos em revistas de circulação nacional com arbitragem científica (1) .....      | 16        |
| B.3. Publicações em actas de encontros científicos (13) .....                            | 16        |
| C. Comunicações em Congressos, Simpósios e Conferências Científicas (30) .....           | 19        |
| C.1. Palestras e Cursos ministrados por convite (7) .....                                | 19        |
| C.2. Comunicações Orais em Eventos Científicos (4).....                                  | 20        |
| C.3. Comunicações sobre a forma de painel em congressos internacionais (17) .....        | 21        |
| C.4. Comunicações sobre a forma de painel em congressos nacionais (2).....               | 24        |
| D. Actividade como revisora de artigos científicos.....                                  | 24        |
| <b>Agradecimentos .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>Preâmbulo .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>Objetivos .....</b>   | <b>33</b> |
| <b>Lista de Figuras.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>Lista de Tabelas .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>Lista de Siglas e Acrónimos .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>Resumo.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>Abstract .....</b>  | <b>55</b> |
| <b>I. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>65</b> |
| <b>II. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>83</b> |
| II.1. População, desenho metodológico do estudo e selecção da amostra.....               | 86        |

|  |            |
|--|------------|
| II.2. Identificação e conservação dos isolados .....   | 90         |
| II.3. Caracterização fenotípica dos isolados.....  | 90         |
| II.4. Caracterização genotípica dos isolados .....   | 93         |
| II.5. Métodos Estatísticos .....   | 99         |
| <b>III. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>101</b> |
| <b>Estudo 1. Caracterização fenotípica e genotípica dos determinantes de resistência e virulência em isolados de <i>Klebsiella</i> spp. multiresistentes de um centro hospitalar de cuidados terciários em Lisboa, durante 31 anos consecutivos.....</b> | <b>103</b> |
| III.1. Caracterização da amostra.....  | 104        |
| III.2. Caracterização fenotípica: perfil de suscetibilidade .....  | 109        |
| III.2.1. Suscetibilidade a antibióticos .....  | 109        |
| III.2.2. Suscetibilidade à tigeciclina e fosfomicina .....   | 115        |
| III.2.3. Suscetibilidade de acordo com critérios CLSI e EUCAST .....   | 117        |
| III.3. Determinantes genéticos de resistência: produção de $\beta$ -lactamases .....   | 123        |
| III.4. Ambiente genético.....  | 128        |
| III.4.1. Grupos de incompatibilidade plasmídica .....  | 128        |
| III.4.2. Transposições.....  | 131        |
| III.4.3. Pesquisa de integrões .....   | 132        |
| III.5. Determinantes genéticos de virulência.....  | 135        |
| III.6. Relação entre o perfil de resistência e virulência dos isolados de <i>Klebsiella</i> spp.....   | 144        |
| <b>Estudo 2. Caracterização clonal de isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtores da cefotaximase CTX-M-15 e da carbapenemase KPC-3 em 5 hospitais de Lisboa e na comunidade .....</b>   | <b>151</b> |
| III.7. Caracterização clonal da amostra.....   | 153        |
| III.7.1. Perfil genéticos dos isolados produtores de CTX-M-15 e KPC-3 .....  | 153        |

|   |            |
|---|------------|
| III.7.2. Identificação clonal .....   | 156        |
| III.7.2.1. Isolados produtores de CTX-M-15 .....  | 156        |
| III.7.2.2. Isolados produtores de KPC-3.....  | 159        |
| <b>Estudo 3. Ocorrência e Diversidade de <math>\beta</math>-lactamases em espécies produtoras de carbapenemases ...</b>   | <b>163</b> |
| III.8. Identificação de $\beta$ -lactamases .....   | 165        |
| <b>Estudo 4. Caracterização dos determinantes de resistência e virulência de estirpes de <i>Klebsiella</i> spp. isoladas em Infecções do Trato Urinário (ITU) na comunidade e no hospital .....</b> | <b>169</b> |
| III.9. Etiologia da infecção do trato urinário adquirida na comunidade (ITU-AC) .....   | 171        |
| III.10. <i>Klebsiella</i> spp. em infecções do trato urinário adquiridas na comunidade .....  | 174        |
| III.10.1 Caracterização do hospedeiro.....  | 175        |
| III.10.2. Caracterização fenotípica: perfil de suscetibilidade.....   | 180        |
| III.10.3. Determinantes genéticos de resistência: produção de $\beta$ -lactamases .....   | 191        |
| III.10.4. Determinantes genéticos de virulência.....  | 195        |
| <b>IV. CONCLUSÃO.....</b>   | <b>205</b> |
| <b>V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>211</b> |
| <b>VI. ANEXOS .....</b>   | <b>243</b> |
| ANEXO 1. Provas Microbiologia Clínica.....  | 245        |
| ANEXO 2. Assentimento da FMUL à Tese de Doutoramento.....   | 247        |
| ANEXO 3. Parecer Favorável da Comissão de Ética da FMUL .....   | 249        |
| ANEXO 4. Parecer Orientadora.....   | 251        |
| ANEXO 4. Parecer Co-Orientador .....  | 255        |
| ANEXO 4. Parecer da Direcção Médica Ibérica da entidade empregadora (original) .....  | 257        |
| ANEXO 5. Parecer da Direcção Médica Ibérica da entidade empregadora (tradução livre).....   | 258        |



---

## Produção e actividade científica resultante da Tese

### A. Bolsas, Prémios e Distinções (4)

- **Bolsa de Mérito** atribuída pela Associação para o Desenvolvimento do Ensino e Investigação em Microbiologia (ADEIM), 2009

Associação sem fins lucrativos de utilidade pública sediada na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa~

- **Prémio Melhor Comunicação**, 2009

Cátia Caneiras, Luis Lito, José Melo-Cristino, Aida Duarte. "CTX-M-15: Clonal dissemination and horizontal spread among *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from bacteremia during 7 years at Hospital de Santa Maria". Congresso Nacional MicroBiotec'09, 28-30 Novembro, 2009

- **Prémio Melhor Comunicação Livre**, 2017

Caneiras C, Lito L, Melo-Cristino J, Duarte A. "Determinantes de resistência e virulência em isolados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de infeções hospitalares". 1º Congresso Internacional IACS – Inovação e Multidisciplinaridade em Controlo de Infecção, 26 de Outubro, 2017

- **Distinção como revisor**, 2018

Journal of Clinical Medicine, MDPI. Factor de impacto 5,583 (2017), Q1 categoria "Medicine, General & Internal".

---

## B. Publicações Científicas (16)

### B.1. Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica (2)

- Caneiras, C.; Calisto, F.; Jorge da Silva, G.; Lito, L.; Melo-Cristino, J.; Duarte, A. First Description of Colistin and Tigecycline-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing KPC-3 Carbapenemase in Portugal. *Antibiotics* 2018, 7, 96
- Cátia Caneiras, Luis Lito, Sagrario Mayoralas-Alises, Salvador Diaz-Lobato, José Melo-Cristino, Aida Duarte, Virulence and resistance determinants of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Portuguese tertiary university hospital centre over a 31-year period, *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.11.001>

### B.2. Artigos em revistas de circulação nacional com arbitragem científica (1)

- F. Calisto; C. Caneiras; S. Cerqueira; L. Lito; J. Melo-Cristino; A. Duarte, “Carbapenemase KPC-3 em estirpes de *Klebsiella pneumoniae* numa unidade hospitalar,” *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 2012, 8 (3): 127-134

### B.3. Publicações em actas de encontros científicos (13)

- Cátia Caneiras, Filipa Nunes, Luís Lito, José Melo-Cristino, M. Salgado, Aida Duarte, “Replicon Typing of plasmids from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase”, *Clinical Microbiology and Infection*, S326-327, 2009
- Caneiras, Cátia; Calisto, Filipa; Narciso, Ana; Arriaga, Sofia; Melo-Cristino, José; Duarte, Aida. "Resistance and virulence characterization of CTX-M15 and KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* clinical



---

isolates," *Clinical Microbiology and Infection* 17, S4: 270, 2011

- Caneiras, Cátia; Calisto, Filipa; Moura, R.; Augusto, M.; Silva, Gabriela; Melo-Cristino, José; Duarte, Aida. "Multicentre evaluation of in vitro activity of tigecycline against extended-spectrum- $\beta$ -lactamases and multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* clinical isolates," *Clinical Microbiology and Infection* 17, S4: 689, 2011
- C. Caneiras, F. Calisto, G. Da Silva, T. Amores, L. Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte, "First identification of colistin and tigecycline-resistant *Acinetobacter baumannii* producing KPC-3 carbapenemase in Portugal," *Proceedings of the 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Londres, Reino Unido, 2012
- C. Caneiras, F. Calisto, G. da Silva, L. Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte "Impact of antibiotic resistance and beta-lactamase carriage on virulence of *Klebsiella* spp.," *Proceedings of the 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Londres, Reino Unido, 2012
- C. Caneiras, G. da Silva, J. Melo-Cristino, A. Duarte, "Virulence and resistance characteristics of *Klebsiella pneumoniae* causing community-acquired urinary tract infection.," *Proceedings of the 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, London, UK, 2012
- G. Da Silva, C. Caneiras, F. Calisto, A. Duarte, "Tigecycline: an alternative antibiotic therapy against multidrug resistant *Enterobacteria* and *Acinetobacter baumannii*?," *Conference of the BPS Clinical Pharmacological Section, British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 73, 2012
- C. Caneiras, L. Marques Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte, "Virulence profile evolution in *Klebsiella pneumoniae* isolates: from TEM-1 to KPC-3," *Proceedings of the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Amsterdam, The Netherlands, 2016

- 
- C. Caneiras, L. Marques Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte, “Fosfomycin as an alternative antibiotic against KPC-3 producer isolates, including those resistant to tigecycline and/or colistin,” Proceedings of the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, The Netherlands, 2016
  - C. Caneiras, L. Marques Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte “Effects of CLSI and EUCAST clinical breakpoints on antibiotic susceptibility test reporting of CTX-M-15 ESBL and KPC-3 carbapenemase *Klebsiella pneumoniae* isolates,” Proceedings of the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, The Netherlands, 2016
  - C. Caneiras, L. Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte, “Determinantes de resistência e virulência em isolados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de infeções hospitalares,” Revista Evidências, IV Supl.Out. 2017, p. 23, 2017
  - Caneiras, C., Mayoralas-Alises, S., Lito, L., Melo-Cristino, J., Duarte, A., “Antimicrobial resistance and pathogenic potential of KPC-3 carbapenemases by *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Portugal: a greatest threat to human health,” Proceedings of the 15th International Conference on Home Mechanical Ventilation (JIVD) & 6th European Respiratory Care Association Congress (ERCA): p85, 2018
  - Cátia Caneiras, Luis Lito, José Melo-Cristino, Aida Duarte, “The Burden of Hospital-Acquired Infections (HAI): Can the “Back to Basics” Be the Solution? – A 30 Years Overview of HAI by *Klebsiella Pneumoniae* in a Tertiary Care Centre in Portugal”, Port J Public Health, 36(suppl 1):1–34, p31, 2018

---

## C. Comunicações em Congressos, Simpósios e Conferências Científicas (30)

### C.1. Palestras e Cursos ministrados por convite (7)

- Caneiras, C., “Resistência a Antibióticos: produção de  $\beta$ -lactamases em isolados Gram-negativo,” Workshop Resistência a Antibióticos do Gabinete de Informação, Promoção e Educação para a Saúde (GIPES) da Associação de Estudantes da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2006
- Caneiras, C., “*The most threatening bacteria to Human Health*” integrado na Mesa Redonda “Antibióticos”, 11<sup>as</sup> Jornadas de Atualização em Doenças Infecciosas do Hospital de Curry Cabral do Centro Hospitalar Lisboa Central, 25 de Janeiro, Lisboa, Portugal, 2018
- Caneiras, C., “Importância clínica e epidemiológica das Enterobactérias multi-resistentes: a tempestade silenciosa”, Ciclo de Conferências sobre Doenças Infecciosas do Serviço de Doenças Infecciosas do Centro Hospitalar Lisboa Norte, 13 de Abril, Lisboa, Portugal, 2018
- Caneiras, C., “Superbactérias e Resistência a Antibióticos,” III Jornadas de Cuidados Respiratórios em Enfermagem - Associação Científica dos Enfermeiros (ACE), em parceria com o Centro Hospitalar de Lisboa Central EPE (CHLC), 19 Abril, Lisboa, Portugal, 2018
- Caneiras, C., “Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde e Resistência a Antibióticos,” II Curso Teórico-Prático em Ventilação Mecânica Não Invasiva, Promovido por Praxair com apoio científico da Universidade do Porto, Sociedade Portuguesa de Pneumologia e Fundação Portuguesa de Pneumologia, 12 de Maio, Viseu, Portugal, 2018

- 
- Caneiras, C., “Resistência a antibióticos em estirpes Gram-negativo: o silêncio antes da tempestade,” 19<sup>as</sup> Jornadas de Pneumologia em Medicina Familiar, 03 de Maio, Lisboa, Portugal, 2018
  - Caneiras, C., “Hospital-acquired infections by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: An old hospital management challenge in a new technology era”, Public Health, Women's Health, Nursing and Hospital Management Conference, December 03-04, Lisbon, Portugal, 2018

## C.2. Comunicações Orais em Eventos Científicos (4)

- C. Caneiras, F. Calisto, G. Da Silva, L. Lito, J. Melo Cristino, A. Duarte, *Enterobacteriaceae* isolates and KPC-3 carbapenemase in Portugal: overview of 2010-2011, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), London, 2012
- C. Caneiras, L. Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte, “Uncommon Virulence Potential in ST-14 KPC-3 *Klebsiella pneumoniae*: a high risk clone in Portugal”, 7th Congress of European Microbiologists, 9-13 July, Valencia, Spain, 2017
- C. Caneiras, L. Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte, “Determinantes de resistência e virulência em isolados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de infeções hospitalares: da TEM-1 à KPC-3”, 1<sup>o</sup> Congresso Internacional IACS 2017, 26-27 Outubro, Santa Maria da Feira, Portugal, 2017
- Cátia Caneiras, Luis Lito, José Melo-Cristino, Aida Duarte, “The Burden of Hospital-Acquired Infections (HAI): Can the “Back to Basics” be the Solution? – A 30 Years Overview of HAI by *Klebsiella pneumoniae* in a Tertiary Care Centre in Portugal”, 27th Congress of European Association of Hospital Managers (EAHM), 26-28 September, Cascais, Portugal

### C.3. Comunicações sobre a forma de painel em congressos internacionais (17)

- Cátia Caneiras, Filipa Nunes, Luís Lito, José Melo-Cristino, M. Salgado, Aida Duarte, "Replicon Typing of plasmids from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase", 19<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 16-19 Maio, Helsinki, Finlândia, 2009
- Calisto, Filipa; Narciso, Ana; Caneiras, Cátia; Duarte, Aida. Plasmídeos como veículos de disseminação de genes de resistência e virulência, COIFFA – Conferência Ibero-Americana de Faculdades de Farmácia, Lisbon, 2011
- Caneiras, Cátia; Calisto, Filipa; Moura, R.; Augusto, M.; Silva, Gabriela; Melo-Cristino, José; Duarte, Aida. 2011 "Multicentre evaluation of in vitro activity of tigecycline against extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* clinical isolates", R2314. 21<sup>st</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) and 27<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy (ICC), 7-10 Maio, Milan, Italia, 2011
- Caneiras, Cátia; Calisto, Filipa; Narciso, Ana; Arriaga, Sofia; Melo-Cristino, José; Duarte, Aida. 2011. "Resistance and virulence characterization of CTX-M15 and KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates", P1043. 21<sup>st</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) and 27<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy (ICC), 7-10 Maio, Milan, Italia, 2011
- G. Da Silva, C. Caneiras, F. Calisto, A. Duarte, "Tigecycline: an alternative antibiotic therapy against multidrug resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*?", Conference of the British Pharmacology Society, 2012

- 
- C. Caneiras, F. Calisto, G. Da Silva, T. Amores, L. Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte, “First identification of colistin and tigecycline-resistant *Acinetobacter baumannii* producing KPC-3 carbapenemase in Portugal”, 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, UK, 2012
  - C. Caneiras, G. da Silva, J. Melo-Cristino, A. Duarte, “Virulence and resistance characteristics of *Klebsiella pneumoniae* causing community-acquired urinary tract infection.” 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, UK, 2012
  - C. Caneiras, F. Calisto, G. da Silva, L. Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte “Impact of antibiotic resistance and beta-lactamase carriage on virulence of *Klebsiella* spp.” 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, UK, 2012
  - C. Caneiras, L. Marques Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte “Effects of CLSI and EUCAST clinical breakpoints on antibiotic susceptibility test reporting of CTX-M-15 ESBL and KPC-3 carbapenemase *Klebsiella pneumoniae* isolates”, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, The Netherlands, 2016
  - C. Caneiras, L. Marques Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte, “Fosfomycin as an alternative antibiotic against KPC-3 producer isolates, including those resistant to tigecycline and/or colistin”, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, The Netherlands, 2016
  - C. Caneiras, L. Marques Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte, “Virulence profile evolution in *Klebsiella pneumoniae* isolates: from TEM-1 to KPC-3”, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, The Netherlands, 2016
  - C. Caneiras, L. Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte, “Antimicrobial resistance and virulence profile in community and hospital-acquired urinary tract infections caused by *Klebsiella pneumoniae*”, In 11th

---

International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM XI), ESCMID-ESGEM Conference, 9-12 March, Estoril, Portugal, 2016

- C. Caneiras, L. Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte, “Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae*: multiclonal dissemination of CTX-M-15 extended spectrum  $\beta$ -lactamase”, 11th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM XI), ESCMIDESGEM Conference, 9-12 March, Estoril, Portugal, 2016
- C. Caneiras, L. Lito, J. Melo-Cristino, A. Duarte, “Uncommon Virulence Potential in ST-14 KPC-3 *Klebsiella pneumoniae*: a high risk clone in Portugal”, 7th Congress of European Microbiologists, 9-13 July, Valencia, Spain, 2017
- Caneiras, C., Mayoralas-Alises, S., Lito, L., Melo-Cristino, J., Duarte, A., “Antimicrobial resistance and pathogenic potential of KPC-3 carbapenemases by *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Portugal: a greatest threat to human health,” 15<sup>th</sup> International Conference on Home Mechanical Ventilation (JIVD) & 6<sup>th</sup> European Respiratory Care Association Congress (ERCA), March 15-17, Lyon, France, 2018
- C. Caneiras, J. Melo Cristino, L. Lito, S. Mayoralas-Alises, A. Duarte. “Uncommon accumulation of multidrug resistance and virulence potential in carbapenemase ST-14 KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Portugal: a high risk threat”, 28th International Congress of the European Respiratory Society, 15–19 September, Paris, France, 2018
- C. Caneiras, S. Mayoralas Alises, L. Lito, J. Melo Cristino, A. Duarte. “Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae*: multiclonal dissemination of CTX-M-15 Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase”, 28th International Congress of the European Respiratory Society, 15–19 September, Paris, France, 2018

---

#### C.4. Comunicações sobre a forma de painel em congressos nacionais (2)

- Filipa Nunes, Cátia Caneiras, Luis Lito, José Melo-Cristino, Aida Duarte, “Transmissão do gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*”, Infecção associada à prestação de cuidados de saúde, Porto, Portugal, 2009
- Calisto, Filipa; Narciso, Ana; Caneiras, Cátia; Duarte, Aida. “Plasmídeos como veículos de disseminação de genes de resistência e virulência,” 4º Congresso Pandemias na Era da Globalização e 2º Simpósio Nacional de Medicina do Viajante, P42, Coimbra, Portugal, 2011

#### D. Actividade como revisora de artigos científicos

- Journal of Medical Microbiology (2017-),
- International Journal of Environmental Research and Public Health (2018-)
- Microorganisms (2018-)
- Medical Sciences (2018-)
- Journal of Clinical Medicine (2018-)



## Agradecimentos

*Há um tempo  
em que é preciso abandonar  
as roupas usadas,  
que já têm a forma  
do nosso corpo,  
e esquecer os nossos  
caminhos  
que nos levam sempre  
aos mesmos lugares.  
É o tempo da travessia  
e se não ousarmos fazê-la,  
teremos ficado para sempre,  
à margem de nós mesmos.*

**Fernando Pessoa**

---

Ao meu marido, por me ter acompanhado noites e fins de semana no Laboratório, pelas férias no ECCMID, por me acompanhar nos entusiasmos e frustrações da investigação e produção científica. Pela Mariana e Joana, bens mais preciosos da nossa vida. Por estar sempre lá. Para me permitir fazer o que apenas por mim podia ser feito.

À querida Professora Aida, por 13 anos de partilha. Pessoal, Profissional, de Experiências e de um Amor Maior à Microbiologia Clínica e, em especial, à *Klebsiella pneumoniae*. Um pedido de desculpa por nem sempre ter conseguido estar à altura das expectativas e pelas desilusões que pode ter tido com o facto de não me ter sido possível dedicar em exclusivo à área Académica e da Investigação. Bem gostaria!...

Ao Professor Melo Cristino, por autorizar o estudo molecular das estirpes e, principalmente, por ter aceite ser meu co-orientador apesar do estudo incidir sobre  $\beta$ -lactamases em bactérias Gram negativo, distantes das estirpes de *Streptococcus* spp. ou *Staphylococcus* spp. que tão bem conhece. Pela disponibilidade que sempre demonstrou ao longo destes anos e pelo espírito crítico e assertividade que me ajuda a ser melhor.

Ao Dr. Luís Lito, pelo entusiasmo sobre os desafios e novas tendências na Resistência aos Antimicrobianos. Aprendo sempre nas nossas conversas.

À Dr<sup>a</sup> Antónia Ferreira do Instituto de Formação Avançada da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, pela sua dedicação aos alunos, pela tranquilidade que transmite e pela sua permanente disponibilidade e capacidade de ver soluções onde outros vêem problemas.

Ao Professor Doutor António Vaz Carneiro, pelo acolhimento no Instituto de Saúde Ambiental (ISAMB) da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa como Investigadora Integrada, que tanto significou para mim. Pela atenção que dedica, pela confiança e ânimo que transmite.

---

À equipa do ISAMB (Ana, Osvaldo, Lia, Isabel, Rodrigo, Daniela, Joana, André, Miguel, Paula e Luís) que me permitiram reencontrar o silêncio e a tranquilidade, tão importantes para a escrita científica. Um agradecimento especial à Ana Virgolino, pelo cuidado e atenção que dedicou à minha integração no ISAMB, fazendo sentir-me em casa. Por me permitirem “revitalizar” um laboratório escondido, que tanto me faz lembrar o adorado Laboratório 125.

Ao Eng<sup>o</sup> José Ramon Calvo pelo apoio incondicional que me deu quando com ele partilhei este meu desafio e a importância que o mesmo tem para mim. À Prof. Doutora Sagrario Mayoralas Alises, ao Prof. Doutor Salvador Diaz Lobato e Prof. Doutor João Carlos Winck pelo entusiasmo, ânimo e confiança nesta fase final do percurso.

Finalmente, mas nunca em último, aos meus irmãos, pelo exemplo que espero ser. À minha mãe, pelo método de estudo, de trabalho, interesse científico e desafio intelectual, que sempre incutiu. Ao meu Pai, pelo orgulho e amor incondicional que permanentemente demonstra; à Gena, pelas boas energias e confiança nas minhas capacidades quando eu própria duvidei delas.



## Preâmbulo

Doutorada em Ciências Farmacêuticas na área de Microbiologia pela Universidade de Lisboa em 1988, com a dissertação *Klebsiella pneumoniae* - Aspectos epidemiológicos e genéticos, a Professora Doutora Aida Duarte dedicou toda a sua vida às *Enterobacteriaceae*. A sua perseverança e espírito lutador permitiu preservar uma ampla colecção de isolados bacterianos multiresistentes, para a qual contribuíram múltiplos laboratórios da comunidade, de hospitais públicos e privados e, em especial, o Laboratório de Microbiologia de um Centro hospitalar universitário de cuidados de saúde terciários, que ao longo de mais de três décadas disponibilizou as estirpes para estudos moleculares. De facto, a história da multirresistência bacteriana e o conhecimento das  $\beta$ -lactamases em isolados Gram-negativo em Portugal é indissociável desta colaboração há muito estabelecida, da qual resultaram relevantes marcos científicos no estudo da Bacteriologia Clínica desde 1980, dos quais se pode destacar a primeira identificação em Portugal de vários mecanismos de resistência em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, como a produção da  $\beta$ -lactamase de espectro restrito TEM-1, a  $\beta$ -lactamase de espectro alargado CTX-M-15 e a carbapenemase KPC-3.

O presente trabalho surge na continuidade da tese de Mestrado em Microbiologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, com o tema “Bacterémias: determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.”, o qual permitiu demonstrar a capacidade que as bactérias multiresistentes produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs) têm, para além da resistência aos antibióticos, de colonizar e persistir no hospedeiro durante anos. No entanto, a tese de Mestrado incidiu maioritariamente nos isolados de *E. coli*, que demonstrou características epidemiológicas distintas dos isolados clínicos de *Klebsiella* spp.. A frequência de isolamento de estirpes de *Klebsiella* spp. produtores de ESBL em situações invasivas foi de 10,3%,

---

valor concordante com os mais elevados da Europa. Adicionalmente, demonstraram superior complexidade genética, variabilidade clonal e potencial de disseminação plasmídica em comparação com estirpes de *E. coli*. Desta forma, impunha-se a necessidade de estudos mais detalhados em isolados clínicos de *Klebsiella* spp., bem como a necessidade de ampliar o tempo de estudo.

*"A não ser que os numerosos atores envolvidos actuem urgentemente e de modo coordenado, o mundo caminha para uma era pós-antibióticos, onde infeções comuns e feridas menores, que têm sido tratadas há décadas, podem voltar a matar."*

*Keiji Fukuda, OMS (2014)*





## Objetivos

O objetivo geral da presente tese consiste em caracterizar a epidemiologia molecular e identificar os determinantes genéticos de resistência e virulência de uma população de estirpes de *Klebsiella* spp. multiresistentes isoladas em Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde, nomeadamente em ambiente hospitalar e na comunidade.

Os objetivos específicos são:

1. Caracterizar fenotipicamente os isolados bacterianos pela identificação do perfil de suscetibilidade a um antibiótipo comum;
2. Detectar a presença de genes que codificam para a produção de  $\beta$ -lactamases;
3. Caracterizar o ambiente genético, pela pesquisa de elementos móveis associados à resistência bacteriana;
4. Identificar os genes que codificam para factores de virulência, como adesinas fimbriais, hemolisina, tipo capsular e aerobactina;
5. Caracterizar o perfil molecular e clonal dos isolados produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado e carbapenemases;
6. Caracterizar o perfil de resistência e virulência de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* isoladas em Infecções do Trato Urinário da comunidade;
7. Comparar o perfil de virulência dos isolados clínicos produtores de  $\beta$ -lactamases provenientes de infeções de ambiente hospitalar e da comunidade.



## Lista de Figuras

- Figura 1.** Mecanismos de resistência que as bactérias utilizam para impedir acção dos antibióticos.
- Figura 2.** Percentagem de isolados invasivos de *K. pneumoniae* com multiresistência em Portugal durante o período de 2006-2012.
- Figura 3.** Representação da resistência de isolados clínicos de *K. pneumoniae* no que infere a resistência combinada – cefalosporinas de 3ª geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos e carbapenemos.
- Figura 4.** Representação esquemática do transposição *Tn4401* identificado em isolados produtores de carbapenemase KPC.
- Figura 5.** Proveniência dos isolados hospitalares de *K. pneumoniae*: produtos biológicos, estudos de colonização e ambientais.
- Figura 6.** Frequência de distribuição dos isolados de *K. pneumoniae* por tipologia de serviço clínico.
- Figura 7.** Perfil de suscetibilidade dos isolados de *K. pneumoniae* do Grupo A (1980-1989) aos antibióticos mais frequentemente utilizados nos anos 80.
- Figura 8.** Perfil de suscetibilidade dos isolados de *K. pneumoniae* do Grupo A, B, C e D a um antibiotipo comum.
- Figura 9.** Perfil de suscetibilidade dos isolados hospitalares de *K. pneumoniae* do Grupo D (2009-2011) aos antibióticos fosfomicina e tigeciclina.
- Figura 10.** Comparação do perfil de suscetibilidade dos isolados hospitalares de *K. pneumoniae* dos Grupos C (2002-2008) e D (2009-2011), de acordo com os critérios de suscetibilidade do CLSI e EUCAST.

- Figura 11.** Perfil de suscetibilidade ao imipenemo dos isolados do Grupo D, de acordo com os critérios do CLSI e EUCAST publicados em 2010 e 2014.
- Figura 12.** Grupos de incompatibilidade plasmídica identificados em isolados de *K. pneumoniae* produtores de CTX-M-15 e KPC-3.
- Figura 13.** Factores de virulência identificados em isolados de *K. pneumoniae* de acordo com produtos biológicos e locais de identificação.
- Figura 14.** Frequência de distribuição dos factores de virulência de acordo com  $\beta$ -lactamases produzidas.
- Figura 15.** Determinação do perfil genético de isolados de *K. pneumoniae* produtores da  $\beta$ -lactamase de espectro alargado CTX-M-15 e carbapenemase KPC-3.
- Figura 16.** Perfil Genético de isolados de *K. pneumoniae* produtores de CTX-M-15 provenientes de distintos serviços hospitalares (Medicinas, Cuidados Intensivos, Cirurgia, Ambulatório) dentro do mesmo Centro Hospitalar terciário em Lisboa.
- Figura 17.** Distribuição geográfica dos laboratórios de análises clínicas da comunidade.
- Figura 18.** Caraterização demográfica dos isolados de *Klebsiella* spp. por grupo etário, categoria de infecção e sexo em infeções do trato urinário da comunidade.
- Figura 19.** Estudo de suscetibilidade aos antibióticos dos 50 isolados de *K. pneumoniae* isoladas a partir de infeções do trato urinário (ITU) em laboratórios da comunidade.
- Figura 20.** Perfil de virulência dos isolados de *K. pneumoniae* da comunidade.
- Figura 21.** Perfil de virulência de isolados *K. pneumoniae* provenientes de infeções trato urinário (ITU) hospitalares e da comunidade.
- Figura 22.** Padrões de virulência dos isolados com Infecção do Trato Urinário (ITU) da Comunidade e Hospitalares

## Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Proposta de classificação das  $\beta$ -lactamases de acordo com suscetibilidade antimicrobiana: ESBL de classe A (ESBL<sub>A</sub>), ESBL variadas (ESBL<sub>M</sub>) e ESBL com actividade hidrolítica aos carbapenemos (ESBL<sub>CARBA</sub>).
- Tabela 2.** Critérios de corte definidos pelo CLSI e EUCAST para testes de suscetibilidade antimicrobiana por método de difusão de discos.
- Tabela 3.** *Primers* e condições de amplificação dos genes de resistência *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>NDM</sub> desenhados em laboratório.
- Tabela 4.** *Primers* e condições de amplificação dos genes de virulência desenhados em laboratório.
- Tabela 5.** Categorização dos isolados em estudo de acordo com o ano de identificação.
- Tabela 6.** Critérios de CLSI e EUCAST publicados em 2010 e 2014 para interpretação do teste de suscetibilidade ao antibiótico imipenemo.
- Tabela 7.** Determinantes de resistência dos isolados de *K. pneumoniae*: fenótipo de resistência e  $\beta$ -lactamase produzida.
- Tabela 8.** Integrões de Classe 1 e identificação de cassetes genéticas.
- Tabela 8.** Prevalência dos factores de virulência em isolados de *K. pneumoniae* produtores de  $\beta$ -lactamases identificados em infeções hospitalares.
- Tabela 10.** Padrões de virulência identificados nos isolados de *K. pneumoniae* identificados num centro hospitalar terciário de Lisboa.
- Tabela 9.** Perfil de virulência dos isolados de *K. pneumoniae* identificados em infeções hospitalares de acordo com  $\beta$ -lactamase produzida.
- Tabela 10.** Identificação ST dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de CTX-M-15 por ano e local de isolamento.

- 
- Tabela 11.** Variação clonal dos isolados de *K. pneumoniae* identificados.
- Tabela 12.** Diversidade de  $\beta$ -lactamases produzidas associadas à KPC-3, por espécie bacteriana.
- Tabela 13.** Caracterização fenotípica dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* produtores de KPC-3.
- Tabela 14.** Distribuição dos microrganismos identificados em uroculturas de ITU da comunidade.
- Tabela 15.** Prevalência de *Klebsiella* spp. de acordo com as localidades e regiões nas quais se inserem os laboratórios de análises clínicas da comunidade nos quais foram identificados os isolados bacterianos.
- Tabela 16.** Caracterização da Infecção do Trato Urinário (ITU) na comunidade: tipologia de infecção e factores de risco do hospedeiro.
- Tabela 17.**  $\beta$ -lactamases identificadas em isolados de *K. pneumoniae* isoladas na comunidade (n=50), sexo e idade do hospedeiro e localização geográfica laboratório de isolamento
- Tabela 18.** Perfil de virulência dos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de ITU da Comunidade e Hospitalar.
- Tabela 19.** Perfis de virulência mais frequentes dos isolados de *K. pneumoniae* de acordo com a produção de  $\beta$ -lactamases e do ambiente no qual foram identificados (comunidade e hospital).
- Tabela 20.** Perfil de virulência dos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de ITU da Comunidade e Hospitalar.
- Tabela 21.** Perfis de virulência mais frequentes dos isolados de *K. pneumoniae* de acordo com a produção de  $\beta$ -lactamases e do ambiente no qual foram identificados (comunidade e hospital).

## Lista de Siglas e Acrónimos

|            |   |
|------------|---|
| AIM        | Autorização de Introdução no Mercado  |
| AMC        | Amoxicilina-Ácido clavulânico   |
| ATC        | <i>Anatomical Therapeutic Chemical Code</i>   |
| BLAST      | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>  |
| CAZ        | Ceftazidima   |
| CDC        | <i>Centre for Disease Control and Prevention</i>  |
| CDDEP      | <i>Center for Disease Dynamics, Economics &amp; Policy</i>  |
| CIP        | Ciprofloxacina  |
| CLSI       | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>  |
| CTX        | Cefotaxima  |
| DDD        | Dose Diária Definida  |
| DGS        | Direção-Geral da Saúde  |
| DHD        | Dose Diária Definida por 1000 habitantes e por dia  |
| DNA        | Ácido desoxirribonucleico ( <i>deoxyribonucleic Acid</i> )  |
| EARS - NET | <i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>   |
| ECDC       | <i>European Center for Disease Prevention and Control</i>   |
| EDTA       | Ácido etilenodiamino tetra-acético  |
| ESAC - NET | <i>European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network</i>   |
| ESBL       | $\beta$ -lactamases de espectro alargado  |
| ESCAPE     | <i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Clostridium difficile, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacteriaceae (Klebsiella pneumoniae, Enterobacter spp., Escherichia coli e Proteus mirabilis)</i> |

---

|             |  |
|-------------|--|
| ESCMID      | <i>European Society for Microbiology and Infectious Diseases</i>   |
| ESKAPE      | <i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp.</i> |
| EUCAST      | <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>  |
| FMUL        | Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa  |
| FOS         | Fosfomicina  |
| FOX         | Cefoxitina   |
| gapA        | gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase  |
| GM          | Gentamicina  |
| HAI - NET   | <i>Healthcare Acquired Infection Network</i>   |
| HAI-Net ICU | <i>Healthcare Acquired Infection Network Intensive Care Unit</i>   |
| HAI-Net SSI | <i>Healthcare Acquired Infection Network Surgical Site Infections</i>  |
| HAIs        | Healthcare Associated Infections   |
| HALT        | <i>Healthcare-Associated Infection and Antimicrobial Use in Long-Term Care Facilities</i>  |
| HELICS      | <i>Hospitals in Europe Link for Infection Control</i>  |
| IACS        | Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde  |
| IC          | Intervalo de Confiança   |
| IDSA        | Infectious Disease Society of America  |
| ILC         | Infeção do Local Cirúrgico   |
| IMP         | Imipenemo  |
| INCS        | Infeção Nosocomial da Corrente Sanguínea   |
| INFARMED    | Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.  |
| infB        | Factor 2 de iniciação da tradução  |
| INSA        | Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge  |

---



---

|        |  |
|--------|--|
| IS     | Sequência de inserção  |
| ITU    | Infeções do trato urinário (ITU)   |
| ITU-AC | Infecção do trato urinário adquirida na comunidade                                 |
| ITU-AH | Infecção do trato urinário adquirida no hospital                                   |
| KPC    | <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase   |
| mdh    | Malato desidrogenase   |
| MHA    | Meio Müller-Hinton agar  |
| MLST   | <i>Multilocus Sequence Typing</i>  |
| MRSA   | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina                                 |
| NASTC  | <i>National Antimicrobial Susceptibility Testing Committees</i>                    |
| NCBI   | <i>National Center for Biotechnology Information</i>                               |
| NNIS   | <i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>                                 |
| ORF    | <i>Open reading frame</i>  |
| PBCI   | Precauções Básicas de Controlo de Infecção   |
| PCR    | <i>Polymerase Chain Reaction</i>   |
| pgi    | Fosfoglucose isomerase   |
| phoE   | Fosfoprina E   |
| PNCI   | Programa Nacional de Controlo de Infecção  |
| PPCIRA | Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos |
| RAPD   | <i>Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis</i>                                 |
| rpoB   | Subunidade $\beta$ da RNA polimerase B   |
| SDS    | Dodecil sulfato de sódio   |
| ST     | Sequence Type  |
| TAE    | Solução tampão de Tris, Ácido acético e EDTA                                       |

---

---

|      |   |
|------|---|
| TBE  | Solução tampão de Tris, Ácido bórico e EDTA |
| TIG  | Tigeciclina                                 |
| tonB | Transdutor energético periplasmático        |
| Tris | Tris(hidroximetil)aminometano               |
| UCCI | Unidade de Cuidados Continuados Integrados  |
| UCI  | Unidade de Cuidados Intensivos              |
| ULS  | Unidades Locais de Saúde                    |
| USF  | Unidades de Saúde Familiar                  |
| VE   | Vigilância Epidemiológica                   |

## Resumo

O isolamento de estirpes de *Klebsiella* spp. multirresistentes em Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (IACs) constitui um sério problema de Saúde Pública a nível Mundial, com Portugal a apresentar as taxas de resistência mais elevadas da Europa. Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou pela primeira vez uma lista de microrganismos resistentes aos antibióticos considerados prioritários para o desenvolvimento de novos antibióticos, lista na qual as bactérias Gram-negativo, categoria na qual se inclui a *Klebsiella* spp., são consideradas agentes patogénicos de prioridade crítica, dando relevo à necessidade de promover estudos que contemplem estes microrganismos.

Embora esteja descrita uma associação entre a elevada mortalidade em situação de infeções por *Klebsiella* spp. multirresistentes e uma superior identificação de factores de virulência, esta relação não é clara e consensual. De facto, pouco é conhecido sobre os factores de virulência em *Klebsiella* spp. em isolados produtores de  $\beta$ -lactamases e sua importância na patogenicidade destes isolados, bem como a relação entre a resistência e a virulência. Várias questões permaneciam em aberto quando iniciámos o estudo, especialmente a questão de saber se estirpes multiresistentes de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* apresentam uma acumulação de factores de virulência que aumente o seu potencial patogénico ou se são oportunistas, situação na qual é a resistência que confere vantagem selectiva, principalmente em hospedeiros comprometidos. O interesse nesta temática justifica-se, assim, pela necessidade de aumentar o conhecimento nos isolados de *Klebsiella* spp., facto que assume especial relevância se considerarmos a emergência de isolados do género *Klebsiella* spp. em doentes da comunidade e a crescente importância em situações severas e invasivas no ambiente hospitalar, tornando-se imperativa a promoção de estudos sobre a resistência, virulência, persistência e disseminação.

Pretendia-se entender também se há especificidade dos factores de virulência identificados de acordo com distintas  $\beta$ -lactamases produzidas e se existia variabilidade dos determinantes de resistência e virulência ao longo dos 30 anos de isolamento das estirpes identificadas em ambiente hospitalar. Adicionalmente, as carbapenemases KPC foram identificadas pela primeira vez em Portugal no decorrer do presente estudo pelo que não existia qualquer dado referente à sua epidemiologia molecular e caracterização genética de resistência e virulência. Por fim, não existia nenhum estudo que evidenciasse o potencial de virulência de isolados clínicos produtores de  $\beta$ -lactamases provenientes da comunidade, bem como a sua comparação com isolados hospitalares.

O objetivo geral da presente tese compreende o estudo epidemiológico molecular de uma população de estirpes de *Klebsiella* spp. multiresistentes isoladas em IACs em ambiente hospitalar e na comunidade, bem como a identificação dos determinantes genéticos de resistência e virulência destes isolados. Por forma a atingir o objectivo proposto foram efectuados quatro estudos (descritos nos correspondentes quatro Estudos) com uma amostra total de 171 isolados: 165 de *Klebsiella* spp. (158 isolados de *K. pneumoniae* e 7 de *Klebsiella oxytoca*), 2 de *E. coli*, 2 *Enterobacter aerogenes*, 1 *Citrobacter freundii* e 1 *Acinetobacter baumannii*.

O **Estudo 1** consistiu na caracterização fenotípica e genotípica dos determinantes de resistência e virulência numa população de estirpes de *Klebsiella* spp. multiresistentes (n=100) de um centro hospitalar de cuidados terciários, durante 31 anos consecutivos (1980-2011), através de uma análise retrospectiva. Para o efeito foi efectuada a caracterização fenotípica dos isolados através da determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos pelo Método de Kirby-Bauer. Os resultados foram interpretados segundo os critérios do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Foi efectuada a pesquisa fenotípica de

metalo- $\beta$ -lactamases e carbapenemases do Grupo A através da técnica de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e ácido borónico, respectivamente. A caracterização genotípica dos isolados foi efectuada através da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), nomeadamente na i) identificação dos determinantes genéticos de resistência, pesquisando os genes que codificam para as  $\beta$ -lactamases SHV, DHA, CTX-M, KPC, IMP, VIM, OXA, TEM, NDM e na determinação do ambiente genético, através da pesquisa de integções (Classe 1 e Classe 3) e do transposição *Tn4401* em isolados produtores de KPC. Foi efectuada a identificação dos grupos de incompatibilidade plasmídica através da técnica de *Replicon Typing*. Para a extracção de DNA plasmídico foi aplicada a técnica de Kado e Liu. Os determinantes genéticos de virulência foram identificados através da pesquisa dos genes de virulência associados à *Klebsiella pneumoniae*, nomeadamente *K2*, *khe*, *fimH*, *mrkDV1*, *mrkDV2-4* e *iucC*. Os produtos de PCR e o DNA extraído do gel de agarose foram purificados, sequenciados e foi analisada a sequência nucleotídica pelos programas informáticos BLAST e CLUSTALW.

De uma população alvo de isolados bacterianos de *Klebsiella pneumoniae* com perfil de multiresistência, perfil indicativo de produção de  $\beta$ -lactamases ou reduzida suscetibilidade aos carbapenemos foi seleccionada uma amostra representativa de 100 isolados através do método de amostragem aleatória, nomeadamente amostragem estratificada. Os estratos considerados foram obtidos através do perfil fenotípico dos isolados e permitiram a classificação dos 100 isolados em 4 grupos distintintos: Grupo A (n=15), Grupo B (n=12), Grupo C (n=46) e Grupo D (n=27), correspondendo ao período de tempo 1980-1989, 1990-2001, 2002-2008 e 2009-2011, respectivamente. Todos os isolados são provenientes de produtos biológicos, com excepção de 12 isolados do Grupo A, sendo 4 provenientes de estudos ambientais e 8 de colonização. Os restantes 88 são provenientes de urina (31/88, 35%), sangue (21/88, 24%), exsudado purulento (17/88, 19%), secreções brônquicas (17/88, 19%), líquido cefalorraquidiano (1/88, 1%) e catéter (1/88, 1%). Todos os isolados do Grupo A são provenientes da Unidade de Cuidados

intermédios e Intensivos de Neonatologia. Os isolados do Grupo B foram identificados de forma mais frequente em serviços de Medicina (50%) e Cuidados Intensivos (25%). Os isolados do Grupo C são maioritariamente de serviços de Medicina (36%) enquanto os isolados do grupo D foram mais frequentemente identificados em serviços de Cirurgia (48%).

Os resultados obtidos evidenciaram uma crescente resistência ao longo dos anos, com a identificação dos genes de resistência que codificam para  $\beta$ -lactamases de espectro restrito TEM-1 e SHV-1 no Grupo A (1980-1989), a identificação das  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (cefalosporinas) TEM-10 e TEM-24 no Grupo B (2002-2008) e da cefotaximase CTX-M-15 no Grupo C (2009-2011). As estirpes do Grupo D (2009-2011) evidenciaram a presença da carbapenemase KPC-3, sozinha (16/27, 59%) ou em associação com outras  $\beta$ -lactamases, nomeadamente SHV-11 (4/27, 15%), SHV-35 (1/27, 4%) e CTX-M-15 (6/27, 22%). O perfil de virulência predominante tem a presença dos genes codificadores das adesinas fimbriais do tipo 1 e do tipo 3 e da toxina hemolisina (*fimH*, *mrkD-V1*, *khe*). No entanto, de forma cumulativa, os isolados produtores de KPC-3 apresentaram outros factores de virulência que potenciam a sua subsistência no corpo humano, nomeadamente o sideróforo aerobactina, bem como apresentaram predominantemente o serótipo capsular K2, um serótipo associado a infeções mais severas e invasivas dada a protecção que confere às defesas do hospedeiro.

No que infere ao ambiente genético foi identificada a presença de integrões, transposões e plasmídeos, com características distintas de acordo com a  $\beta$ -lactamase produzida. Verificou-se uma menor identificação de integrões da Classe 1 nos isolados mais recentes: Grupo C (67%) e D (56%), em comparação com os Grupos A (87%) e B (100%). Foram identificadas as cassetes genéticas *aadA1/qacEdelta1-aadA1*; *dfrA5/dfrA15-aadA1*; *aacA4/aadA1-dhfrA1* e *dfrA30*, esta última em estirpes produtores de carbapenemases KPC-3 e que confere resistência ao trimetoprim, sendo descrita pela

primeira vez em Portugal no presente trabalho. Os transposões ISEcp1 e *Tn4401-like* foram associados aos genes CTX-M-15 e KPC-3, respectivamente. Os isolados produtores de CTX-M-15 apresentam os grupos de incompatibilidade IncHI1 e IncA/C. Embora os primeiros isolados produtores de KPC-3 apresentassem o grupo de incompatibilidade IncF, os isolados mais recentes apresentam IncF e IncA/C, potenciando desta forma a disseminação horizontal dos genes contidos nestes elementos genéticos móveis.

O **Estudo 2** consistiu numa análise retrospectiva e multicêntrica que compreende a caracterização clonal de estirpes (n=43) produtores da cefotaximase CTX-M-15 (n=16), identificadas em 5 hospitais (n=15) e na comunidade (n=1), e produtores da carbapenemase KPC-3 (n=27). Por forma a proceder à caracterização clonal e avaliar a relação clonal dos isolados recorreu-se à método genotípico M13 PCR fingerprinting, baseado na técnica de *Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis* (RAPD). Os produtos de PCR e o DNA extraído do gel de agarose foram purificados, sequenciados e foi analisada a sequência nucleotídica pelos programas informáticos BLAST e CLUSTALW. De forma a identificar a estrutura clonal foi utilizada a técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST). As sequências nucleotídicas obtidas permitiram definir os alelos de cada locus e de acordo com a combinação de alelos de cada isolado foram identificados os Sequence Types (STs) através da base de dados do Instituto Pasteur. Verificou-se uma elevada variabilidade genética entre as estirpes estudadas, dada a identificação de 22 perfis diferentes por M13 *PCR fingerprinting*. O clone predominante de *Klebsiella pneumoniae* em isolados produtores de CTX-M-15 foi o ST 15, o qual tem sido descrito como apresentando elevado potencial de disseminação e de virulência. Este clone foi identificado no presente estudo em distintos serviços hospitalares da principal unidade hospitalar estudada e em 5 hospitais da região de Lisboa. O isolado produtor de CTX-M-15 identificado na comunidade pertencia também ao clone ST15. Por sua vez, as estirpes produtores de KPC-3 pertenciam ao clone ST14, com exceção dos dois primeiros isolamentos, estirpes nas quais foi

identificado o clone ST11.

O **Estudo 3** consistiu na determinação da ocorrência e diversidade de  $\beta$ -lactamases em espécies resistentes aos carbapenemos no período compreendido entre Abril de 2009 e Junho de 2011, através de uma análise coorte prospectiva. Foram identificados 40 isolados, nomeadamente *Klebsiella pneumoniae* (n=27), *Klebsiella oxytoca* (n=7), *Escherichia coli* (n=2), *Enterobacter aerogenes* (n=2), *Citrobacter freundii* (n=1) e *Acinetobacter baumannii* (n=1). Foi efectuada a pesquisa dos genes que codificam para as  $\beta$ -lactamases SHV, DHA, CTX-M, KPC, IMP, VIM, OXA, TEM e NDM pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados, sendo posteriormente analisada a sequência nucleotídica pelos programas informáticos BLAST e CLUSTALW. Neste estudo verificou-se a identificação pela primeira vez da associação de uma cefalosporinase DHA-1 em isolados de *Klebsiella oxytoca* produtores de KPC-3. Esta combinação aumenta a resistência dos isolados para a cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima e aztreonamo, comparativamente o isolados que produzem apenas a carbapenemase KPC-3. Em isolados de *K. oxytoca* foi também identificada a SHV-12, a qual difere da SHV-1 por substituição de três aminoácidos e aumenta a resistência dos isolados à ceftazidima e cefotaxima. Para as estirpes de outras espécies (*E. coli*, *E. aerogenes*, *C. freundii* e *A. baumannii*), para além dos genes de KPC-3 foram identificados as  $\beta$ -lactamases de espectro restrito TEM-1 e SHV-1. Verifica-se, desta forma, que ainda que todas as estirpes sejam Gram-negativo, que partilhem a família *Enterobacteriaceae* (no caso da *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *E. aerogenes* e *C. freundii*) ou o mesmo género *Klebsiella* spp. (no caso da *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*) apresentam diferente caracterização genética de resistência. Os isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases KPC-3 apresentaram superior diversidade genética em comparação com as restantes estirpes bacterianas, dada a acumulação de genes de resistência identificados.



O **Estudo 4** consistiu na análise retrospectiva e multicêntrica de isolados de *Klebsiella pneumoniae* (n=50) identificados em Infecções do Trato Urinário (ITU) da comunidade, cujas características de virulência foram comparadas com isolados provenientes de ITU de ambiente hospitalar (n=32) com o objectivo de conhecer as características moleculares bacterianas em ambos os ambientes. Por forma a comparar se existia um perfil de virulência específico associado à produção da mesma  $\beta$ -lactamase, os resultados dos isolados produtores de  $\beta$ -lactamases da comunidade (n=6) foram também comparados com os isolados produtores de  $\beta$ -lactamases do ambiente hospitalar (n=100). Nos isolados de *K. pneumoniae* da comunidade foram identificadas  $\beta$ -lactamases em 12% (6/50) da amostra, nomeadamente  $\beta$ -lactamases de espectro restrito e alargado (TEM-1, -24, -156, SHV-11, -33 e CTX-M-15). O perfil de virulência dos isolados da comunidade caracteriza-se pela presença dos genes *fimH*, *mrkD*<sub>V2-4</sub> e *khe*, distinguindo-se dos hospitalares pela variante da fímbria do tipo 3. A variante 2-4 confere superior capacidade de aderência, comparativamente à identificada nos isolados hospitalares (variante 1). Verificou-se que os perfis de virulência são distintos entre os isolados da comunidade e do hospital, ainda que a enzima  $\beta$ -lactamase seja comum, identificando-se menos factores de virulência por isolado. No entanto, as estirpes da comunidade apresentaram maior variabilidade nos perfis de virulência e nos grupos de incompatibilidade plasmídica (Inc FIA, A/C, HI2, FIIA) identificados, quando em comparação com os isolados hospitalares, indicativos de diferenças genéticas da espécie *K. pneumoniae* de acordo com o ambiente no qual é identificada. A diversidade genética é fundamental para que populações de microrganismos se adaptem ao meio ambiente. Quanto maior a diversidade genética, mais apta está a espécie para resistir às mudanças ambientais, motivo pelo qual os isolados da comunidade devem ser igualmente monitorizados.

Como conclusão, os resultados encontrados nos quatro estudos e que compõem a presente tese evidenciaram que:

1. Se verificou um aumento progressivo de resistência desde o isolamento de estirpes produtores da  $\beta$ -lactamase TEM-1, na década de 80, até à emergência das carbapenemases KPC-3 no início da década de 2010. O perfil de suscetibilidade isolados produtores de carbapenemases para a Fosfomicina (>80%) é promissor e evidencia a possibilidade de utilização deste antibiótico para o tratamento de infeções causadas por estes microrganismos. Por sua vez, os resultados obtidos com a Tigeciclina indiciam a necessidade de monitorização do tratamento de microrganismos Gram negativo com este antibiótico, por forma a evitar a emergência de estirpes resistentes a este agente antimicrobiano.
2. Nos isolados hospitalares, identificou-se um fenótipo de virulência em comum entre os isolados e independente da  $\beta$ -lactamase produzida, nomeadamente com a presença de fímbrias do tipo 1 e tipo 3 (associadas à capacidade da aderência e produção de biofilmes) e da hemolisina (associada a quadros severos de infecção). É de notar que nos isolados produtores de carbapenemases KPC-3 o fenótipo de virulência identificado poderá ser utilizado como marcador de patogenicidade, dado apresentar características pouco comuns de acumulação de genes de virulência quando em comparação com os isolados não produtores de KPC, nomeadamente apresentando os factores de virulência do serótipo capsular K2, mais frequentemente identificado em infeções invasivas, e do sideróforo aerobactina, que confere vantagem às bactérias de se desenvolverem em condições de baixas concentrações de ferro.
3. O perfil epidemiológico das estirpes de *K. pneumoniae* produtora da  $\beta$ -lactamase de espectro alargado CTX-M-15, que apresentam predominantemente o clone ST 15 é distinto das produtoras da carbapenemase KPC-3 que apresentam o clone ST 14, substituindo o clone ST 11 identificado nos

primeiros isolados produtores de KPC-3 e diferindo do clone mais comum a nível mundial, ST 258.

4. Dados os resultados obtidos, confirma-se que os isolados de *K. pneumoniae* têm um elevado potencial de disseminação e de virulência, em especial quando são produtoras de carbapenemases. O conhecimento dos mecanismos de resistência aos antibióticos e a caracterização molecular dos isolados hospitalares aumenta a capacidade dos microbiologistas e epidemiologistas na monitorização da propagação da resistência aos antibióticos entre unidades de saúde e na comunidade.

5. A caracterização dos isolados de *K. pneumoniae* responsáveis por infeções urinárias na comunidade e a comparação dos isolados de infeções da comunidade com os isolados provenientes do ambiente hospitalar permitiu conhecer a evolução desta espécie bacteriana nos dois ambientes, tendo-se identificado menos factores de virulência e menos resistência aos antibióticos nas bactérias da comunidade, mesmo quando comparados isolados com a produção da mesma  $\beta$ -lactamase, confirmando não ser este um factor predominante para a virulência em isolados não produtores de KPC-3.

O estudo tem algumas limitações relacionadas com a ausência de dados de caracterização do hospedeiro, nomeadamente a caracterização sócio-demográfica da amostra hospitalar, dados clínicos relevantes (diagnóstico associado à infeção, antibioterapia prévia e mortalidade), bem como a história clínica (proveniência de outra instituição hospitalar, unidade de cuidados continuados ou lar), informação relevante para efeitos de vigilância epidemiológica. A outra limitação prende-se com a selecção da amostra que, sendo representativa da colecção de isolados multiresistentes existente na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa durante 31 anos, não pode ser utilizada para inferir informação quanto à prevalência de estirpes de *Klebsiella* spp. produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado ou carbapenemases no Centro Hospitalar Universitário, de cuidados terciários, em Lisboa, do qual provêm

as amostras. No entanto, a presente tese compreende um estudo epidemiológico molecular que foi realizado numa amostra de dimensão estatisticamente representativa face à colecção existente, com uma abordagem rigorosa, sistemática e muito completa. Acresce ainda que o horizonte temporal do estudo é bastante amplo (31 anos), o que permite analisar a evolução da resistência e virulência de microrganismos mesma espécie, no mesmo ambiente hospitalar. Adicionalmente, foi possível comparar resultados clonais dos isolados produtores de CTX-M-15 com isolados de 4 outras unidades hospitalares da Região de Lisboa, bem como caracterizar isolados identificados em Infecções do Trato Urinário da comunidade e do hospital. Também o estudo de monitorização de isolados resistentes aos carbapenemos permitiu inferir quanto à diversidade de  $\beta$ -lactamases produzidas estirpes do mesmo género (*K. pneumoniae* em comparação com *K. oxytoca*), bem como de espécies distintas como *E. coli*, *E. aerogenes*, *C. freundii* e *A. baumannii*.

Após este trabalho consideramos existir evidência suficiente para afirmar que especial atenção deverá ser dedicada à temática das Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde causadas por *Klebsiella* spp. e, em particular, às estirpes de *K. pneumoniae* produtores da carbapenemase KPC-3 pertencente ao clone de alto risco ST 14. A variabilidade molecular identificada, a acumulação e diversidade de genes de resistência e virulência, bem como a presença de elementos genéticos móveis, em especial nos isolados produtores da carbapenemase KPC-3, indicam um potencial de disseminação horizontal destas estirpes patogénicas intra e inter espécies, que compreende um risco para a Saúde Pública.

A epidemiologia molecular e o conhecimento dos determinantes de resistência e virulência é relevante para uma adequada implementação de medidas de controlo da infecção, de modo a impedir a emergência e a disseminação de estirpes multirresistentes e virulentas, quer no ambiente hospitalar quer na comunidade. A análise da evolução destes isolados indica também o aparecimento de novas  $\beta$ -

---

lactamases mais resistentes e com maior potencial de virulência em ciclos de, aproximadamente, 10 anos. Mudanças na epidemiologia das ESBL impõem novas abordagens terapêuticas e diferenciadas formas de controlo da infecção, com sérias medidas preventivas e um rigoroso controlo e monitorização destes isolados, em ambiente hospitalar e da comunidade.

Esta é uma área de claro interesse para investigação futura dada a limitação actual de opções terapêuticas para as infeções causadas por agentes patogénicos gram-negativo, em especial em infeções causadas por *K. pneumoniae*. Estudos multicêntricos europeus e intercontinentais de monitorização da suscetibilidade antimicrobiana, em especial nos isolados produtores de carbapenemases permitirá esclarecer se o clone de alto risco ST14 identificado em Portugal apresenta noutros países as mesmas características de resistência e virulência identificadas no presente trabalho. Adicionalmente, são requeridos estudos intervencionais que determinem a expressão dos genes de virulência, bem como estudos *in vivo* que permitam esclarecer o impacto dos marcadores de virulência na mortalidade do hospedeiro.

**Palavras Chave:** *Klebsiella pneumoniae*,  $\beta$ -lactamases, Factores de virulência, Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde, Carbapenemase KPC



---

## Abstract

The identification of multiresistant strains of *Klebsiella* spp. in Healthcare Associated Infections (HAIs) is a serious worldwide public health problem, with Portugal presenting the highest resistance rates in Europe. In 2017, the World Health Organization (WHO) published for the first time a list of priority microorganisms for the development of new antibiotics, a list in which Gram-negative bacteria, which includes *Klebsiella* spp., are considered pathogens of critical priority, highlighting the need to promote studies that contemplate this microorganisms.

Although an association between the high mortality in multiresistant *Klebsiella* spp. and identification of virulence factors have been previously described, this relationship is not clear and consensual. In fact, little is known about the virulence factors in *Klebsiella* spp. isolates producing  $\beta$ -lactamases, their importance in the pathogenicity of these isolates, as well as the relationship between resistance and virulence. Several questions remained open when we started the study, especially the question of whether multiresistant strains of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* have an accumulation of virulence factors that increase their pathogenic potential or are opportunistic, a situation in which resistance is a selective advantage, especially in compromised hosts. The interest in this theme is justified by the need to increase knowledge about *Klebsiella* spp. clinical isolates, which is particularly relevant considering the emergence of *Klebsiella* spp. in the community environment and the increasing prevalence on severe and invasive infections, making imperative the promotion of studies on resistance, virulence, persistence and dissemination.

It was also important to understand if there are specificities of the virulence factors according to the different  $\beta$ -lactamases produced and if there was variability of the determinants of resistance and

virulence among the 30 years of isolation of the strains. In addition, KPC carbapenemases were identified for the first time in Portugal during the course of the present study, so there was no previously data regarding their molecular epidemiology and genetic characterization of resistance and virulence. Finally, there was none study that evidenced the virulence potential of clinical isolates producing  $\beta$ -lactamases from community-acquired urinary tract infections, as well as their comparison profile with isolates from the hospital.

The major goal of the present thesis is to perform a molecular epidemiological study of a population of multiresistant strains of *Klebsiella* spp. from HAIs, identified in hospital settings and in the community, as well as the identification of the genetic determinants of resistance and virulence of these isolates. In order to reach the proposed objective, four studies (described in the corresponding four chapters) were carried out with a total sample of 171 isolates: 165 of *Klebsiella* spp. (158 isolates of *K. pneumoniae* and 7 of *K. oxytoca*), 2 of *E. coli*, 2 *E. aerogenes*, 1 *C. freundii* and 1 *A. baumannii*.

**Study 1** includes the phenotypic and genotypic characterization of resistance and virulence determinants in a population of *Klebsiella* spp. (n=100) of a tertiary care hospital center for 31 consecutive years (1980-2011), through a retrospective analysis. The phenotypic characterization of the isolates was performed by determining the susceptibility profile of the bacteria to the antibiotics by the Kirby-Bauer method. The results were interpreted according to the criteria of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Phenotypic research of Group A metallo- $\beta$ -lactamases and carbapenemases was carried out by the acid ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and boronic acid technique, respectively. The genotypic characterization of the isolates was carried out using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, namely i) identification of resistance genetic determinants by screening the genes coding for the  $\beta$ -



lactamases SHV, DHA, CTX-M, KPC, IMP, VIM, OXA, TEM and NDM and the determination of the genetic environment, through the search for integrons (Class 1 and Class 3) and the transposon *Tn4401* in KPC-producing isolates. Identification of the plasmid incompatibility groups was performed by Replicon Typing technique. For the extraction of plasmidic DNA, the Kado and Liu technique was applied. Genetic determinants of virulence were identified by the screening of the virulence genes associated with *K. pneumoniae*, namely *K2*, *khe*, *fimH*, *mrkDV1*, *mrkDV<sub>2-4</sub>* and *iucC*. PCR products and DNA extracted from the agarose gel were purified, sequenced and the nucleotide sequence was analyzed by BLAST and CLUSTALW software.

A representative sample of 100 isolates was selected from a target population of *Klebsiella pneumoniae* isolates with multiresistance profile, indicative of  $\beta$ -lactamase production profile or reduced susceptibility to carbapenems, using a stratified sampling and within this, by random sampling. The isolates were characterized in four groups, namely: Group A (n= 15), Group B (n= 12), Group C (n= 46) and Group D (n = 27), corresponding to the time period 1980-1989, 1990-2001, 2002-2008 and 2009-2011, respectively. All isolates were from biological products, with the exception of 12 isolates from Group A, which were 4 from environmental studies and 8 from colonization. The remaining 88 isolates were recovered from urine (31/88, 35%), blood (21/88, 24%), purulent exudate (17/88, 19%), bronchial secretions (17/88, 19%), cerebrospinal fluid (1/88, 1%) and catheter (1/88, 1%). All isolates from Group A were recovered in Intermediate and Intensive Care Unit of Neonatology. Group B isolates were more frequently identified in Medicine (50%) and Intensive Care (25%). Group C isolates were mostly from medical services (36%) while group D isolates were most frequently identified in surgery (48%).

The results obtained evidenced an increasing resistance over the years, with the identification of resistance genes encoding TEM-1 and SHV-1 restricted spectrum  $\beta$ -lactamases in Group A (1980-1989),

the identification of  $\beta$ -lactamases (cephalosporinases) TEM-10 and TEM-24 in Group B (2002-2008) and cefotaximase CTX-M-15 in Group C (2009-2011). Group D strains (2009-2011) evidenced the presence of KPC-3 carbapenemase, alone (16/27, 59%) or in association with other  $\beta$ -lactamases, namely SHV-11 (4/27, 15%), SHV-35 (1/27, 4%) and CTX-M-15 (6/27, 22%). The predominant virulence profile is the presence of genes coding for fibrin adhesins type 1 and type 3 and haemolysin toxin (*fimH*, *mrkD-V1*, *khe*). However, KPC-3 isolates showed additionally other virulence factors that enhance their subsistence in the human body, namely the aerobactin siderophore, as well as predominantly the K2 capsular serotype, a serotype associated with more severe infections and invasive because of the protection it confers on the host's defenses.

The presence of integrons, transposons and plasmids, with distinct characteristics according to the  $\beta$ -lactamase produced, were identified in the genetic environment. There was a lower identification of Class 1 integrons in the Group C (67%) and D (56%) isolates, compared to Groups A (87%) and B (100%). Were identified the genetic cassettes: *aadA1/qacEdellta1-aadA1*, *dfrA5/frA15-aadA1*, *aacA4/aadA1-dhfrA1* and *dfrA30*, this last one in strains producing KPC-3 carbapenemases, that confers resistance to trimethoprim, and it is described for the first time in Portugal in the present work. The ISEcp1 and *Tn4401*-like transposons were associated with the CTX-M-15 and KPC-3 production, respectively. CTX-M-15 producing isolates had the incompatibility groups IncHI1 and IncA/C. Although the first isolates of KPC-3 presented the IncF incompatibility group, the most recent isolates present IncF and IncA/C, thus enhancing the horizontal dissemination of the genes contained in these mobile genetic elements.

The **Study 2** consisted of an retrospective and multicentric analysis comprising clonal characterization of CTX-M-15 cefotaxime (n=16) strains identified in 5 hospitals (n=15) and in the community (n=1), and KPC-3 carbapenemase producers (n=27). In order to proceed with the clonal characterization and to evaluate

the clonal relation of the isolates, the genotypic method M13 PCR fingerprinting was used, based on Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis (RAPD). PCR products and DNA extracted from the agarose gel were purified, sequenced and the nucleotide sequence analyzed by BLAST and CLUSTALW software. In order to identify the clonal structure, the Multilocus Sequence Typing (MLST) technique was used. The nucleotide sequences obtained allowed to define the alleles of each locus and according to the combination of isolated alleles, Sequence Types (STs) were identified through the Pasteur Institute database. There was a high genetic variability between the studied strains, given the identification of 22 different profiles by M13 PCR fingerprinting. The ST15 clone was the predominant in *K. pneumoniae* CTX-M-15-producing isolates, which has been previously described as having a high potential for dissemination and virulence. This clone was identified in the present study in different hospital services of the main hospital unit studied and in 5 hospitals in the Lisbon region. The CTX-M-15 producing isolate identified in the community also belonged to ST15 clone. In turn, KPC-3 producing strains belonged to ST14 clone, except for the first two isolates, in which was identified the ST11 clone.

**Study 3** consisted in the determination of the occurrence and diversity of  $\beta$ -lactamases in species resistant to carbapenems in the period between April 2009 and June 2011, through a prospective cohort analysis. A total of 40 isolates, including *K. pneumoniae* (n=27), *K. oxytoca* (n=7), *E. coli* (n=2), *E. aerogenes* (n=2), *C. freundii* (n=1) and *A. baumannii* (n=1) were studied. We investigated the genes that encode to SHV, DHA, CTX-M, KPC, IMP, VIM, OXA, TEM and NDM  $\beta$ -lactamases by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The PCR products were purified and sequenced, and the nucleotide sequence was then analyzed by BLAST and CLUSTALW software. In this study, we first identified the association of a cephalosporinase DHA-1 in KPC-3-producing *K. oxytoca* isolates. This combination increases the resistance of the isolates to cefotaxime, ceftazidime and aztreonam antibiotics, compared to isolates that only produce KPC-3 carbapenemase. In *K. oxytoca* isolates, SHV-12 was also identified,

which differs from SHV-1 by the replacement of three amino acids and increases the resistance of the isolates to ceftazidime and cefotaxime. For strains of other genera (*E. coli*, *E. aerogenes*, *C. freundii* and *A. baumannii*), the TEM-1 and SHV-1 restricted spectrum  $\beta$ -lactamases were identified in addition to the KPC-3 genes. It was found that different genetic characterization of resistance exist in these isolates, even though all strains are Gram-negative and share the family *Enterobacteriaceae* (in the case of *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *E. aerogenes* and *C. freundii*) or the same genus *Klebsiella* spp. (in the case of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca*). Additionally, the KPC-3 carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates showed high genetic diversity when compared to the remaining bacterial strains by the accumulation of identified resistance genes.

**Study 4** consisted in a retrospective and multicenter analysis of *K. pneumoniae* isolates (n=50) recovered by community-acquired Urinary Tract Infections (C-UTI), whose virulence characteristics were compared with isolates from hospital-acquired UTI (n=32) in order identify the microorganism molecular characteristics in both environments. In order to compare if there was a specific virulence profile associated with  $\beta$ -lactamase production, the results of the  $\beta$ -lactamase-producing isolates found (n=6) from the community environment were also compared to the isolates  $\beta$ -lactamase-producers identified in the hospital environment (n=100). In the community *K. pneumoniae* isolates,  $\beta$ -lactamases were identified in 12% of the sample(6/50), namely extended and restricted spectrum  $\beta$ -lactamases (TEM-1, TEM-24, TEM-156, SHV-11, SHV-33 and CTX-M-15). The virulence profile of the isolates from the community is characterized by the presence of the *fimH*, *mrkDV<sub>2-4</sub>* and *khe* genes, distinguishing them from hospital by the type 3 fimbriae variant (*mrkDV<sub>1</sub>*). Variant 2-4 confers higher biofilm production capacity. The virulence profiles found were distinct among community and hospital isolates, even if the  $\beta$ -lactamase enzyme were common, with scarcer virulence factors being identified per isolate in the

community strains, when compared with the hospital strains. However, the community strains showed greater variability in the virulence profiles and in the plasmid incompatibility groups found (FIA, A/C, HI2, FIIA), indicative of genetic differences of the *Klebsiella* species according to the environment in which it is identified. Genetic diversity is fundamental for populations of microorganisms to the adaptation to the environment. The greater the genetic diversity, better able the species to withstand environmental changes, which is why isolates from the community should also be monitored.

In conclusion, the results found in the four studies that compose the present thesis showed that:

1. There was a progressive increase in resistance from the isolation of strains producing  $\beta$ -lactamase TEM-1 in the 1980s until the emergence of KPC-3 carbapenemases at the beginning of the decade of 2010. The susceptibility profile of the isolates producing carbapenemases to Fosfomicin (>80%) is promising in the use of this antibiotic for the treatment of infections caused by these microorganisms. In turn, the results obtained with Tigecycline are indicative of the need to monitor the treatment of Gram-negative microorganisms treated with this antibiotic, in order to reduce the emergence of resistant strains.
2. In the hospital isolates, we identified a common virulence phenotype independent of  $\beta$ -lactamase produced, with the presence of type 1 and type 3 fimbriae (associated with the capacity of adhesion and biofilm production) and hemolysin (associated with severe conditions of infection). However, in KPC-3 carbapenemase-producing isolates, the identified virulence phenotype could be used as a marker of pathogenicity because it presents unusual characteristics of accumulation of virulence genes, namely with the identification of the virulence factors K2 capsular type (most frequently identified in invasive infections) and the aerobactin (that confers advantage to the bacteria to the development in conditions of low concentrations of iron).

3. The epidemiological profile of *K. pneumoniae* producing CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, which predominantly contains the ST15 clone is distinct from the KPC-3 carbapenemase producing strains presenting the ST14 clone, replacing the ST11 clone identified in the first KPC-3 producing isolates and differing from the world's most common clone, ST 258.

4. *K. pneumoniae* isolates have demonstrated a high potential for dissemination and virulence which justified why are they often responsible for worldwide hospital outbreaks. Knowledge of antibiotic resistance mechanisms and molecular characterization of hospital isolates increases the ability of microbiologists and epidemiologists to monitor the spread of antibiotic resistance among health units and in the community.

5. Characterization of the isolates of *K. pneumoniae* responsible for urinary infections in the community and the comparison of isolates of community infections with isolates from the hospital environment allowed to know the genetic characteristics of this bacteria in both environments. Less virulence diversity and resistance to antibiotics in bacteria from community-acquired UTI, even when compared with the production of the same  $\beta$ -lactamase acquired in hospital environment, confirming that the  $\beta$ -lactamase produced is not a predominant factor for virulence in non-KPC-3 producing isolates.

The study has some limitations related to the absence of host characterization data, namely the socio-demographic characterization of the hospital sample, relevant clinical data (diagnosis associated with infection, previous antibiotic therapy and mortality), as well as the clinical history (if the patient is provenient from other hospital institution, continuous care unit or from home), information relevant for the purpose of epidemiological surveillance. The other limitation is the selection of the sample, which,

being representative of the collection of multiresistant isolates in the Faculty of Pharmacy of the University of Lisbon for 31 years, can not be used to infer information on the prevalence of strains of *Klebsiella* spp. producers of broad-spectrum  $\beta$ -lactamases or carbapenemases at a tertiary-care University Hospital Center in Lisbon. However, this thesis comprises a molecular epidemiological study that was carried out on a sample of statistically representative size compared to the existing collection, with a rigorous, systematic and very complete approach. Moreover, the time horizon of the study is very wide (31 years), which allows to analyze the evolution of resistance and virulence of the same species, in the same hospital environment. Additionally, it was possible to compare clonal results of CTX-M-15 producing isolates with isolates from 4 other hospital units in the Lisbon Region, as well as to characterize isolates identified in Community and Hospital Urinary Tract Infections. Also the monitoring study of carbapenem resistant isolates allowed us to infer the diversity of  $\beta$ -lactamases produced from the same genus (*K. pneumoniae* compared to *K. oxytoca*), as well as from different genera such as *E. coli*, *E. aerogenes*, *C. freundii* and *A. baumannii*.

After this work, we consider that there is enough evidence to affirm that special attention should be given to the theme of the Health Care Associated Infections caused by *Klebsiella* spp. microorganisms and in particular by *Klebsiella pneumoniae* strains producing KPC-3 carbapenemase and belonging to the high risk clone ST14. The identified molecular variability, accumulation and diversity of resistance and virulence genes, as well as the presence of mobile genetic elements, especially in KPC-3 carbapenemase isolates, indicates a high potential for horizontal dissemination of these intra- and inter-species pathogenic strains, with a clear risk to Public Health.

Molecular epidemiology and knowledge of the determinants of resistance and virulence is relevant for an adequate implementation of infection control measures in order to prevent the emergence and

---

spread of multidrug resistant and virulent strains, both in the hospital and in the community. Analysis of the evolution of these isolates also indicates the emergence of new, more resistant  $\beta$ -lactamases with a greater virulence potential in cycles of approximately 10 years. Changes in the epidemiology of ESBLs impose new therapeutic approaches and different forms of infection control, with serious preventive measures and a strict control and monitoring of these isolates, in hospital and community settings.

This is an area of clear interest for future research given the current limitation of therapeutic options for infections caused by gram-negative pathogens, especially in infections caused by *K. pneumoniae*. European and intercontinental studies of antimicrobial susceptibility monitoring, especially in the isolates producing carbapenemases, will make it possible to clarify whether the high risk clone ST14 identified in Portugal presents in other countries the same characteristics of resistance and virulence identified in the present study. In addition, interventional studies are required to determine the expression of the virulence genes, as well as in vivo studies to clarify the impact of virulence markers on host mortality.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*,  $\beta$ -lactamases, Virulence Factors, Health Care Associated Infections, Carbapenemase KPC



# I. INTRODUÇÃO



---

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Epidemiologia da *Klebsiella* spp.

O género *Klebsiella* é constituído por bactérias ubíquas, frequentemente encontradas na água, no solo e em plantas, assim como nos animais, à superfície das mucosas. Nos humanos, os isolados de *Klebsiella* spp. encontram-se presentes como comensais na nasofaringe e no trato intestinal. As espécies *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* encontram-se frequentemente relacionadas com as infeções associadas a cuidados de saúde, nomeadamente infeções urinárias (6-17%), infeções respiratórias como a pneumonia (7-14%) e septicémias (4-15%).<sup>1,2</sup>

### 2. Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde

A infeção nosocomial tem sido tradicionalmente associada ao ambiente hospitalar. Actualmente, dada a crescente tendência para internamentos de curta duração e maior intervenção dos cuidados prestados fora do ambiente hospitalar, defende-se o conceito de Infeção Associada aos Cuidados de Saúde (IACS). Esta inclui toda a infeção associada a prestação de cuidados de saúde, onde quer que sejam prestados, assim como é independentemente do nível de cuidados (agudos, reabilitação, ambatório, domiciliários).<sup>3</sup>

Nas sociedades desenvolvidas, as IACS representam 5-10% das admissões hospitalares. Em Portugal, no Estudo Português de Prevenção de Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde, realizado em 2012, obteve-se uma prevalência de doentes com IACS de 11%. Em relação ao total de infeções nosocomiais, as mais frequentes foram a infeção respiratória (29%), a urinária (21%) e cirúrgica (18%).<sup>4</sup>

A via de transmissão mais comum é a infecção cruzada, sendo as mãos dos prestadores de cuidados o veículo mais habitual, responsável por 10-20% das infeções nosocomiais. Os dispositivos médicos contaminados (termómetros, endoscópios, eléctrodos) são também veículos de transmissão, assim como o contacto interpessoal, através das habituais vias de transmissão conhecidas para as doenças infecciosas: fecal-oral, via aérea ou gotículas.<sup>1</sup>

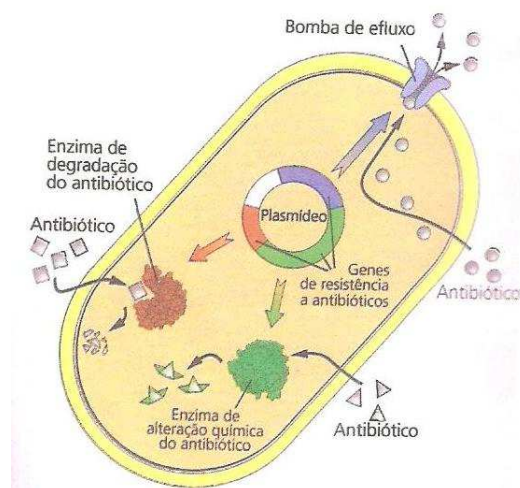
A capacidade destes microrganismos para se disseminar rapidamente levam frequentemente a surtos nosocomiais, especialmente graves quando ocorrem em unidades de neonatologia.<sup>5</sup> De acordo com as estatísticas do *Center of Disease Control and Prevention*, os isolados de *Klebsiella* spp. são responsáveis por 8% das infeções hospitalares endémicas e 3% dos surtos epidémicos,<sup>1</sup> apresentando elevada morbilidade e mortalidade entre os doentes hospitalizados.<sup>6,7</sup> Embora de forma mais frequente os isolados de *Klebsiella pneumoniae* estivessem associados a infeções hospitalares, estudos recentes indicam que começam a ser identificados em infeções na comunidade.<sup>8-10</sup> Por estas razões, acções de prevenção e monitorização dos isolados devem ser prioritárias no âmbito da salvaguarda da Saúde Pública.

### 3. Mecanismos de resistência e produção de $\beta$ -lactamases

As bactérias podem utilizar individualmente ou em associação vários mecanismos para impedir a acção dos antibióticos (Figura 1), tais como:

- Alteração do local de acção do antibiótico.
- Diminuição da concentração intracelular do antibiótico, impedindo a sua entrada, por impermeabilização da membrana celular, ou exportando o antibiótico, através de bombas de efluxo.

- Inativação do antibiótico, que na maior parte dos casos ocorre por acção enzimática (produção de  $\beta$ -lactamases).



**Figura 1.** Mecanismos de resistência que as bactérias utilizam para impedir acção dos antibióticos.<sup>4</sup>

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são um importante grupo de antibióticos, dada a sua eficácia terapêutica e a sua baixa toxicidade para os animais, incluindo o Homem. No entanto, as enzimas  $\beta$ -lactamases, expressas por genes cromossomais ou plasmídicos, hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico sendo este um dos principais mecanismos de resistência associado a este grupo de antibióticos.<sup>11</sup> Em 1970, estes isolados eram principalmente *Klebsiellas* spp. resistentes aos aminoglicosídeos, aminopenicilinas e cefalotina.<sup>12</sup> Na sequência da introdução, nos anos de 1970 e 1980, de novas cefalosporinas para tratar infeções por bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro restrito ou penicilinases, surgiram na Europa, no início dos anos 1980, isolados produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBL).<sup>13-15</sup>

A prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL alcançou valores preocupantes na última década. Têm sido descritos por todo o mundo valores de prevalência muito diversos, que variam entre países e instituições.<sup>16-18</sup> Em Portugal, num estudo efectuado em 2007 num hospital central de Lisboa foi

identificada uma incidência de isolados de *Klebsiella* spp. produtores de ESBL de 10,3%.<sup>19</sup> Em 2009, a incidência foi de 11,4% nos Estados Unidos da América (EUA) e 17,1% na Europa, sendo que em 2011 os valores aumentaram para 16,1% e 40,4%, respectivamente. Em determinadas regiões ou hospitais, a incidência poderá, no entanto, ser superior ao reportado.<sup>20</sup>

De acordo com Ambler, que em 1969 propôs uma classificação com base estrutural, as  $\beta$ -lactamases podem ser classificadas em quatro classes de acordo com a sua sequência de aminoácidos: as classes A (penicilinasas), C (cefalosporinasas) e D (oxacilinasas) compreendem as serino- $\beta$ -lactamases (serina no centro activo) e a classe B (metalo- $\beta$ -lactamases) compreende as  $\beta$ -lactamases com iões de zinco no centro activo.<sup>15</sup> Apesar das duas classificações mais citadas a nível mundial serem a de Ambler<sup>15</sup> e a de Bush-Jacoby-Medeiros, proposta em 1995 e que apresenta uma classificação funcional,<sup>12</sup> em 2009 foi sugerida uma nova classificação mais acessível para os clínicos e outros profissionais de controlo de infecção (Tabela 1) uma vez que apresenta como base a suscetibilidade antimicrobiana das ESBL produzidas pelos isolados.<sup>7</sup>

As enzimas TEM e SHV são ceftazidimases, tendo sido descritas até à década de 90 como as enzimas ESBL mais frequentes.<sup>1</sup> As proteínas do tipo SHV apresentam uma evolução e variabilidade semelhante às TEM e têm sido encontradas predominantemente em isolados de *K. pneumoniae*.<sup>21,22</sup> Na Europa, os isolados de *Klebsiella* produtores de  $\beta$ -lactamases resistentes à ceftazidima mais frequentemente identificadas eram as SHV-5 enquanto as TEM-10 e TEM-12 eram prevalentes nos Estados Unidos.<sup>7,23</sup> No entanto, a frequência e identificação de TEM e SHV têm sido ultrapassada pelas enzimas do tipo CTX-M, cefotaximases, que apresentam uma actividade cerca de 35 vezes superior com a cefotaxima como substrato, comparativamente à ceftazidima. Desde a sua primeira descrição em 1986 têm vindo a aumentar exponencialmente, sendo actualmente conhecidas cerca de 120 variantes deste grupo de

acordo com a sua sequência amino-ácídica. A ESBL prevalente é agora a CTX-M-15, inicialmente identificada na Índia, e que rapidamente se espalhou pela Europa e pelo mundo.<sup>7</sup>

**Tabela 1.** Proposta de classificação das  $\beta$ -lactamases de acordo com suscetibilidade antimicrobiana: ESBL de classe A (ESBL<sub>A</sub>), ESBL variadas (ESBL<sub>M</sub>) e ESBL com actividade hidrolítica aos carbapenemos (ESBL<sub>CARBA</sub>).<sup>7</sup>

|                             | ESBL <sub>A</sub>   | ESBL <sub>M</sub>   | ESBL <sub>CARBA</sub>  |
|-----------------------------|---|---|--|
| Classes $\beta$ -lactamases | <i>Elevada prevalência</i><br>CTX-M ESBL<br>TEM ESBL<br>SHV<br>VEB<br>PER                         | <i>ESBL<sub>M-C</sub> (AmpC plasmídica)</i><br>CMY<br>FOX<br>MIR<br>MOX<br>DHA<br>LAT<br>BIL<br>ACT<br>ACC  | <i>ESBL CARBA<sub>A</sub></i><br>KPC<br>GES-2, -4, -5, -6, -8<br>NMC<br>SME<br>IMI-1, -2   |
|                             | <i>Reduzida prevalência</i><br>GES-1, -3, -7, -9<br>SFO-1<br>BES-1<br>BEL-1<br>TLA<br>IBC<br>CMTa | <i>ESBL<sub>M-D</sub> (OXA ESBL)</i><br>Grupo OXA-10<br>Grupo OXA-13<br>Grupo OXA-2<br>OXA-18<br>OXA-45   | <i>ESBL<sub>CARBA-B</sub> (MBL)</i><br>IMP<br>VIM<br>SPM-1<br>GIM-1<br>SIM-1<br>AIM-1  |
|                             |   |   | <i>ESBL<sub>CARBA-D</sub> (OXA-carbapenemases)</i><br>Grupo OXA-23<br>Grupo OXA-24<br>OXA-48b<br>Grupo OXA-58  |
| Definição operacional       | Não susceptível às cefalosporinas de espectro alargado e efeito sinérgico com ácido clavulânico   | Não susceptível às cefalosporinas de espectro alargado<br>E<br>Identificação fenotípica (ESBL <sub>M-C</sub> )<br>OU<br>Identificação genotípica (ESBL <sub>M-D</sub> ) | Não susceptível às cefalosporinas de espectro alargado e a, pelo menos, um carbapenemo<br>E<br>Identificação de ESBL <sub>CARBA</sub> com métodos fenotípicos ou genotípicos |

As enzimas da classe C são enzimas codificadas por um gene cromossômico em bactérias Gram-negativo, sendo expressas a um nível muito baixo. A sua expressão verifica-se após indução por antibióticos como a cefoxitina. A expressão contínua do gene *ampC* traduz-se por um fenótipo característico com resistência à cefoxitina, às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações e às aminopenicilinas e ausência de inibição pelo ácido clavulânico. Estas enzimas são denominadas de extended spectrum AmpC e a sua presença está associada à mobilização do gene *bla*<sub>AmpC</sub> para plasmídeos. As AmpC plasmídicas do tipo FOX, MOX, CMY e DHA têm sido encontradas em *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella* spp.<sup>11,13</sup>

As  $\beta$ -lactamases do tipo OXA caracterizam-se pela elevada actividade hidrolítica para a oxacilina e cloxacilina e conferem resistência à ampicilina e cefalotina, tal como as da classe A. No entanto, são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico.<sup>22</sup> Estas enzimas constituem um grupo bastante variável, estando descritas cerca de 150 variantes, com características fenotípicas e genotípicas muito diferentes, em que algumas podem ter 20% de homologia ao nível da sequência aminoacídica.<sup>24</sup>

Dentro das metalo- $\beta$ -lactamases, as principais enzimas são as IMP e as VIM que têm sido identificadas em várias áreas geográficas.<sup>25-27</sup> As metalo- $\beta$ -lactamases são carbapenemases que hidrolisam os carbapenemes (imipenemo e meropenemo), assim como vários  $\beta$ -lactâmicos incluindo cefamicinas. As bactérias que produzem estas enzimas são também resistentes aos inibidores das  $\beta$ -lactamases (ácido clavulânico, sulbactam) e são sensíveis ao EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). De um modo geral, os genes *bla*VIM e IMP estão inseridos em integroões da classe 1.<sup>28</sup>

Existem também outras carbapenemases que pertencem à classe molecular A, que inclui as famílias das  $\beta$ -lactamases KPC e GES, inibidas por ácido borónico e classe D, que inclui as carbapenemases OXA,



encontradas maioritariamente em *Acinetobacter baumannii*.<sup>24</sup> Recentemente, foram identificadas em isolados de *K. pneumoniae* a OXA-48, OXA-163 e OXA-181.<sup>29</sup> Estudos recentes reportam a ocorrência de um surto de *K. pneumoniae* produtores de CTX-M-15 que evoluiu para um surto nosocomial de *K. pneumoniae* produtores de OXA-48 e CTX-M15 com grande heterogeneidade fenotípica,<sup>30</sup> assim como a disseminação da OXA-48 por vários países da Europa.<sup>31</sup>

#### 4. Multirresistência aos antibióticos

Uma vez que a produção de ESBL é frequentemente acompanhada pela multirresistência aos antibióticos, as opções terapêuticas tornam-se cada vez mais limitadas. A resistência aos antibióticos constitui um grave problema à escala mundial, que se traduz num inevitável aumento de morbilidade e da mortalidade, e que terá como consequência a diminuição da qualidade de vida e o aumento dos custos com a saúde e os cuidados médicos.<sup>32,33</sup> A emergência de isolados resistentes aos novos antibióticos faz pairar o espectro de, num futuro próximo, não haver opções terapêuticas para tratar infeções bacterianas.<sup>34</sup>

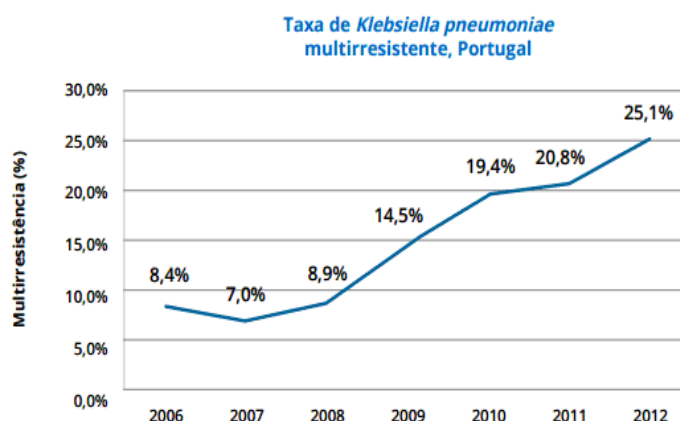
Em 2008, Rice L.B.<sup>35</sup> agrupou as 6 principais bactérias que constituem particular preocupação em termos de disseminação e aquisição de resistência a antibióticos, designando-as pelo acrónimo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.). Posteriormente outros autores<sup>36,37</sup> sugeriram a alteração para ESCAPE, um acrónimo mais inclusivo com objectivo de integrar o *Clostridium difficile* (como o novo C) e as *Enterobacteriaceae* (novo E final), incluindo desta forma a *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*). Em 2013, Pendleton *et al.* revêem a relevância clínica destes isolados, dando especial ênfase ao *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, *Staphylococcus*

*aureus* resistente à meticilina, *Klebsiella pneumoniae* produtora de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenemo e *Enterobacter* spp. resistente às cefalosporinas de terceira geração,<sup>38</sup> cujo impacto é reforçado em 2015 pelo Relatório Mundial do *Center for Disease Dynamics, Economics & Policy* (CDDEP).<sup>39</sup>

Programas de monitorização da resistência aos antibióticos em microrganismos com relevância clínica são promovidos pelas entidades americanas, como o *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS) do *Centre for Disease Control and Prevention* (CDC) e por entidades homólogas europeias como o *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net) do *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC).<sup>33</sup> O *ResistanceMap* ([www.resistancemap.org](http://www.resistancemap.org)) é uma ferramenta desenvolvida pelo CDDEP que permite aos utilizadores visualizarem de forma interactiva uma colecção de dados referentes à resistência aos antibióticos (39 países) e tendências de uso de antibióticos (69 países) reportados por várias entidades mundiais.<sup>39</sup>

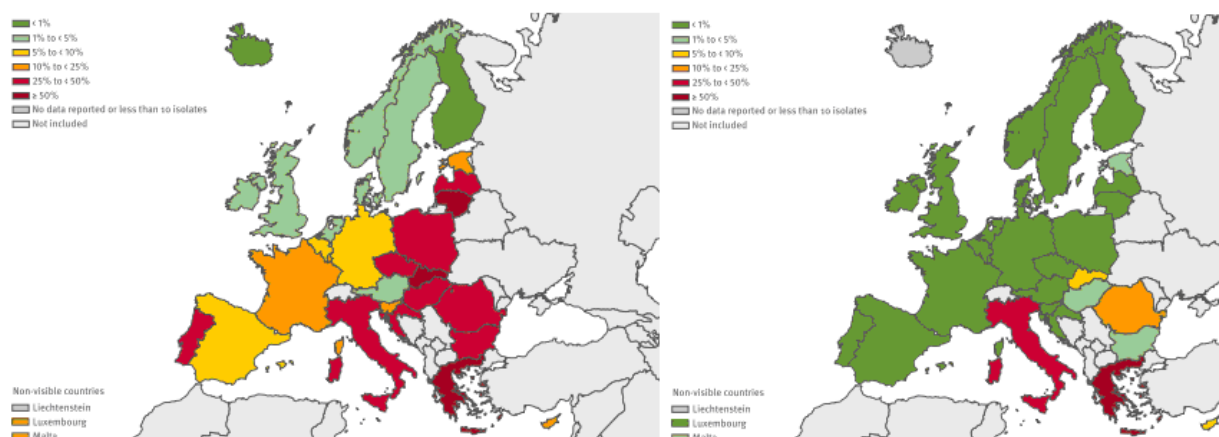
Portugal possui uma Rede Nacional de Vigilância Epidemiológica de Resistências aos Antimicrobianos cuja coordenação se encontra integrada no Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos (PPCIRA), um dos nove programas de saúde prioritários do Ministério da Saúde português. O Despacho 15423/2013 de 26 de novembro determina e regula esta estrutura de gestão, a qual se prolonga da Direção-Geral da Saúde (DGS). até às unidades de saúde, sejam unidades locais de saúde (ULS), centros hospitalares, hospitais, agrupamentos de centros de saúde, unidades de saúde familiar (USF) ou unidades de cuidados continuados integrados (UCCI). Em 2013, um protocolo realizado entre a DGS e o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) promoveu o alargamento da Rede Nacional de Vigilância Epidemiológica de Resistências aos Antimicrobianos de 22 laboratórios de microbiologia (todos eles públicos e hospitalares) para cerca de 120 (públicos e privados, hospitalares e

não hospitalares). Destes, cerca de 66 estão atualmente a enviar dados para a Rede de Vigilância, com aumento exponencial da taxa de *K. pneumoniae* multirresistente em Portugal desde 2008 (Figura 2).<sup>40</sup>



**Figura 2.** Percentagem de isolados invasivos de *Klebsiella pneumoniae* com multiresistência em Portugal durante o período de 2006-2012.<sup>40</sup>

No estudo EARS-Net publicado em 2013 (Figura 3),<sup>33</sup> verifica-se que a resistência de *Klebsiella pneumoniae* às cefalosporinas de terceira geração é crescente e muito elevada, sobretudo no leste e sul da Europa. Em Portugal, *Klebsiella pneumoniae* mostra crescente resistência às cefalosporinas de terceira geração, verificando-se um aumento de 27,5% para 38,7% entre 2009 e 2012. É também notória a situação preocupante de Portugal face aos restantes países europeus no que infere à resistência combinada (isto é, resistência às cefalosporinas de 3ª geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos) em isolados de *Klebsiella pneumoniae*. Os valores descritos para Portugal compreendem uma resistência na ordem dos 22-28%, bastante superiores aos descritos em Espanha (7-11%), superados apenas por quatro países: Itália (36-44%), Eslováquia (50-60%), Lituânia (45-60%) e Grécia (52-62%).<sup>33</sup> A taxa de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente é igualmente crescente entre 2006 (8,4%) e 2012 (25,1%) (Figura 3),<sup>40</sup> situação que se mantém em 2014<sup>41</sup> e 2015.<sup>42</sup>



**Figura 3.** Representação da resistência de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* no que infere a resistência combinada – cefalosporinas de 3ª geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (esquerda) e carbapenemos (direita).<sup>33</sup>

No que infere à resistência aos carbapenemos (Figura 3), o valor reportado no EARS-Net por Portugal é de 0-2% e encontra-se nos valores médios da maioria dos países da Europa e bastante abaixo dos valores reportados por Itália (26-32%) e Grécia (58-63%).<sup>33</sup> Usualmente, todos os isolados de *Klebsiella* produtores de ESBL eram susceptíveis aos carbapenemos como o imipenemo ou o meropenem. Ambos os antibióticos são fármacos de eleição em infeções por organismos produtores de ESBL.<sup>34</sup> No entanto, em 2001, a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é identificada pela primeira vez nos Estados Unidos. Esta enzima é responsável por infeções nosocomiais severas e para além da *Klebsiella pneumoniae* pode ser produzida também por outras bactérias.<sup>43</sup> Após a identificação da KPC-1 surgiram várias publicações com uma nova variante, a KPC-2. Uma única alteração num aminoácido da  $\beta$ -lactamase KPC-2 deu origem à KPC-3. Desde então, registou-se uma rápida disseminação de isolados produtores de KPC por todo o mundo.<sup>32,33,44</sup>

## 5. Disseminação da resistência aos antibióticos

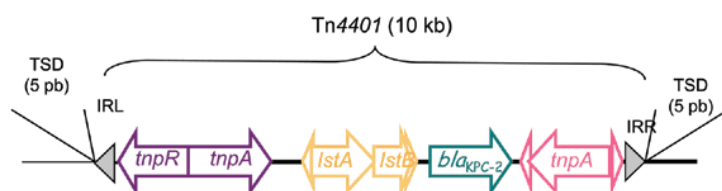
Alguns factores contribuem para a disseminação da resistência aos antibióticos e seu impacto clínico e em saúde pública,<sup>32,34,45</sup> nomeadamente:

- A automedicação, que pode levar ao uso incorrecto da dose do antibiótico, pode seleccionar isolados resistentes entre a flora comensal e originar uma infecção por uma bactéria oportunista resistente ao antibiótico;
- A prescrição, muitas vezes desnecessária ou inapropriada de antibióticos para o tratamento de infeções das vias respiratórias as quais, em cerca de 80% são de origem viral;
- A utilização de antibióticos na alimentação animal como profiláticos das infeções e como promotores de crescimento, como as cefalosporinas. Os animais podem ser o reservatório de genes de resistência, contribuindo para a entrada de bactérias multirresistentes na cadeia alimentar e no meio ambiente;
- A disseminação de bactérias multirresistentes poderá ser facilitada nos hospitais devido a: (i) uma deficiente higiene das mãos; (ii) transferência de doentes entre hospitais com a importação de isolados multirresistentes; (iii) repetidas transferências de doentes colonizados e/ou infectados por isolados resistentes entre o hospital e outras unidades, como lares de acolhimento ou unidades de cuidados continuados;
- O facto de os genes de resistência estarem inseridos em elementos de DNA móveis facilita a sua disseminação entre espécies e géneros bacterianos e, consequentemente limita o tratamento de infeções com bactérias resistentes não só aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, mas também a outras categorias de antibióticos tais como aminoglicosídeos e quinolonas.

A aquisição de elementos genéticos móveis, assim como a perda de regiões de DNA cromossômico nas diferentes linhagens celulares permitem uma dinâmica de evolução clonal assim como tornam possível a disseminação dos genes de resistência e/ou virulência entre diferentes géneros e espécies bacterianas. São determinantes para este fenómeno a existência de estruturas móveis como plasmídeos, integrões e transposões.<sup>46</sup>

Os plasmídeos são elementos genéticos extracromossômicos, cuja dimensão não ultrapassa 1% de um cromossoma normal. São estruturas circularizadas, contendo  $1 - 500 \times 10^3$  pares de bases, e a sua replicação, semelhante à do cromossoma, começa numa região denominada origem de replicação (ori). A informação que transportam não é essencial à fisiologia celular. Porém, conferem às bactérias capacidades adicionais, designadamente resistência a antibióticos, factores de virulência, produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas) e determinadas vias metabólicas.<sup>47</sup> Os plasmídeos são autotransmissíveis por conjugação, o principal meio de transmissão da antibiorresistência entre bactérias.<sup>4</sup> Carattoli *et al.* apresentou em 2005 um método de PCR para identificação de 18 origens de replicação representativas dos grupos de incompatibilidade mais frequentemente associados à resistência antimicrobiana em enterobacteriáceas, o qual contribuiu para um aumento dos estudos sobre esta temática. O método existente até então era trabalhoso, demorado e de difícil aplicação num elevado número de isolados.<sup>48</sup> Plasmídeos com o mesmo controlo de replicação são “incompatíveis”, enquanto plasmídeos com diferentes controlos de replicação são “compatíveis”. Segundo este pressuposto, dois plasmídeos pertencendo ao mesmo grupo Inc não podem ser propagados na mesma linhagem celular. O grupo Inc tem sido frequentemente utilizado para classificar os plasmídeos.<sup>47,49,50</sup> Este método permite traçar a difusão destes elementos genéticos móveis no que infere à resistência antimicrobiana, assim como monitorizar a evolução e disseminação de plasmídeos emergentes.<sup>50</sup>

Os transposões são sistemas genéticos que se podem mover dentro do cromossoma, do plasmídeo para o cromossoma e vice-versa e entre plasmídeos. Estão flanqueados por sequências de inserção (IS) que são essenciais para a transposição deste elemento (Figura 4).<sup>43</sup> Por sua vez, os integrões são elementos de expressão genética que incorporam cassetes genéticos sem promotor de origem exógena, convertendo-os em genes funcionais que podem ser, por exemplo, responsáveis pela resistência a antibióticos.<sup>51</sup> São compostos por três elementos: um local de ligação onde a sequência ou cassete de genes adquirida horizontalmente é integrada por ação da enzima integrase; um gene codificando para a integrase; e um promotor que dirige a expressão da cassete de genes integrada.<sup>4</sup>



**Figura 4.** Representação esquemática do transposão *Tn4401* identificado em isolados produtores de carbapenemase KPC.<sup>43</sup>

## 6. Virulência dos isolados de *Klebsiella* spp.

A patogênese da infecção nosocomial é multifactorial e envolve condições não só inerentes ou intrínsecas ao hospedeiro, como também condições extrínsecas ao mesmo, como sejam o inóculo, o ambiente, a exposição a dispositivos médicos e a antimicrobianos, assim como a virulência do microrganismo.<sup>4</sup>

A cápsula, característica inerente à patogenicidade dos isolados de *K. pneumoniae*, é de natureza polissacárida e as suas subunidades capsulares podem ser classificadas em serótipos. Os isolados com antígenos capsulares K1, K2, K4 e K5 são consideradas as mais virulentas, sendo menos virulentas os isolados com antígenos K6 e superior. Os serótipos K1 e K2 são os predominantes entre os isolados clínicos humanos.<sup>1</sup>

A aderência celular é amplamente descrita como um passo importante para a patogénese da doença dado que confere à bactéria uma capacidade de protecção contra alguns mecanismos mecânicos de protecção bacteriana, aumentando assim a sua habilidade para se multiplicar e invadir os tecidos.<sup>52</sup> As propriedades adesivas nas *Enterobacteriaceae* são mediadas por diferentes tipos de fímbrias. As fímbrias, projecções filamentosas não flagelares na superfície bacteriana, são constituídas por subunidades de pilina. Nos isolados de *K. pneumoniae* predominam dois tipos de fímbrias, nomeadamente as tipo 1 e 3.<sup>53,54</sup>

As fímbrias do tipo 1, codificadas no operão fim, medeiam a aderência a receptores com a manose através da adesina fimH, como mucosas ou células epiteliais do trato urinário, respiratório e intestinal.<sup>55</sup> As fímbrias do tipo 3, codificadas no operão mrk, são manose resistente e promovem a ligação às células endoteliais, do epitélio do trato respiratório e células uropiteliais através da adesina mrkD.<sup>56</sup> Diferentes



variantes de adesina MrkD sobre as fímbrias são conhecidos por exibir capacidade de aderência diferente para as bactérias para ligar a proteínas da matriz extracelular.<sup>57</sup> O seu papel no estabelecimento das infeções ainda não é ainda bem conhecido,<sup>4</sup> embora seja consensual que desempenham um papel crucial na formação de biofilmes.<sup>54</sup>

O crescimento das bactérias no tecido hospedeiro é limitado por mecanismos de defesa do hospedeiro e pela quantidade de ferro disponível. No hospedeiro, o ferro livre disponível para a bactéria, factor essencial para o crescimento bacteriano, é extremamente baixo, pois encontra-se ligado a proteínas intracelulares como a hemoglobina, ferritina e hemosiderina e a proteínas extracelulares como a lactoferrina e transferrina. Muitas bactérias tentam garantir o seu suprimento de ferro no hospedeiro secretando substâncias quelantes, os sideróforos, que solubilizam e ajudam na importação do ferro requerido.<sup>56,58</sup> O género *Klebsiella* sintetiza dois grupos químicos de sideróforos, os do tipo fenolato, como a enterobactina, e do tipo hidroxamato, como a aerobactina. A aerobactina tem menor afinidade para o ferro, no entanto apresenta maior estabilidade e solubilidade, facto que condiciona a sua superior virulência comparativamente à enterobactina.<sup>55</sup>

A hemolisina, codificada pelo gene *khe*, encontra-se associada a quadros severos de infecção. Promove a lise dos eritrócitos, contribuindo para o processo inflamatório através da libertação de ferro, interrupção da fagocitose e causando toxicidade directa para os tecidos.<sup>1,59</sup>

---

## 7. Problema Biológico

O problema biológico que se pretende clarificar é se estirpes multiresistentes de *Klebsiella* spp. identificadas em ambiente hospitalar e na comunidade, apresentam uma acumulação de factores de virulência que aumente o seu potencial patogénico ou se são estirpes oportunistas, situação na qual é a resistência que confere vantagem selectiva, principalmente em hospedeiros comprometidos.

Assim é imperativo o estudo dos factores de virulência em *Klebsiella* spp., em especial nos isolados produtores de  $\beta$ -lactamases, de forma a inferir a sua importância na patogenicidade destes isolados, bem como a relação entre a resistência e a virulência.

O interesse nesta temática justifica-se pela necessidade de aumentar o conhecimento nos isolados Gram-negativo em geral e em estirpes de *Klebsiella* spp. em particular, facto que assume especial relevância se considerarmos a emergência de isolados do género *Klebsiella* spp. multiresistentes em infeções invasivas e difíceis de tratar.

## II. MATERIAL E MÉTODOS



## II. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho incidiu principalmente sobre *K. pneumoniae* por ser um dos principais agentes patogénicos de infeções associadas aos cuidados de saúde e pela crescente importância clínica desta espécie. De forma a cumprir os objetivos do presente trabalho, foram efectuados quatro estudos, nomeadamente:

**Estudo 1.** Caraterização fenotípica e genotípica dos determinantes de resistência e virulência em isolados de *Klebsiella* spp. multiresistentes de um centro hospitalar de cuidados terciários em Lisboa, durante 31 anos consecutivos.

**Estudo 2.** Caraterização clonal de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores da cefotaximase CTX-M-15 e da carbapenemase KPC-3 em 5 hospitais de Lisboa e na comunidade.

**Estudo 3.** Determinação da ocorrência e diversidade de  $\beta$ -lactamases em espécies Gram-negativo resistentes aos carbapenemos num hospital terciário em Lisboa.

**Estudo 4.** Caraterização dos determinantes de resistência e virulência em isolados de Infeções do Trato Urinário (ITU) adquiridos na comunidade e no hospital.

Foi considerada uma amostra total de 171 estirpes bacterianas: 165 *Klebsiella* spp. (158 *K. pneumoniae* e 7 *K. oxytoca*), 2 *Escherichia coli*, 2 *Enterobacter aerogenes*, 1 *Citrobacter freundii* e 1 *Acinetobacter baumannii*. Apenas um isolado da mesma espécie por doente foi considerado. Os mesmos isolados foram considerados em mais de um estudo. As estirpes bacterianas foram obtidas no âmbito da rotina clínica dos Hospitais ou Laboratórios da comunidade do qual provêm. O presente trabalho foi aprovado pelo Comité de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, em reunião de 16 de Fevereiro de 2011.

## II.1. População, desenho metodológico do estudo e selecção da amostra

### Estudo 1.

No Laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa existe, desde 1980 até à actualidade, um amplo historial de isolados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de um Centro hospitalar universitário de cuidados terciários em Lisboa que conta com cerca de 1.500 camas e serve uma população de 155 mil habitantes. A par do apoio que presta às populações da sua zona de influência directa, garante referenciação diferenciada em múltiplas áreas clínicas, no âmbito regional e nacional, assim como aos países de expressão portuguesa.

### **População alvo**

A população alvo em estudo consiste nas estirpes de *Klebsiella* spp. multiresistentes provenientes de um centro hospitalar de cuidados terciários em Lisboa, durante 31 anos consecutivos (1980-2011). Foram considerados como critérios de inclusão a existência de perfil fenotípico de multiresistência e/ou perfil indicativo de produção de  $\beta$ -lactamases e/ou reduzida suscetibilidade aos carbapenemos, bem como a conservação dos isolados a -80°C. Foram excluídos os isolados que não cumpriam os critérios de inclusão mencionados.

### **Desenho metodológico do estudo**

Estudo retrospectivo e unicêntrico.

### **Seleção da amostra**

Foram seleccionados 100 isolados representativos de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, identificados no período de tempo decorrido entre 1980 e 2011. Foi apenas considerado um isolado por doente. Os estratos considerados foram obtidos através do perfil fenotípico dos isolados e permitiram a classificação dos 100 isolados em 4 grupos distintivos: Grupo A (n=15), Grupo B (n=12), Grupo C (n=46)

e Grupo D (n=27), correspondendo ao período de tempo 1980-1989, 1990-2001, 2002-2008 e 2009-2011, respectivamente.

## **Estudo 2.**

### **População alvo**

A população alvo em estudo consiste nas estirpes de *Klebsiella pneumoniae* multiresistentes e produtores da cefotaximase CTX-M-15 identificadas em Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde em ambiente hospitalar e na comunidade.

Foram considerados como critérios de inclusão a identificação prévia como estirpes de *K. pneumoniae* e a identificação molecular de produção de  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 e/ou produção da carbapenemase KPC-3. Foram excluídos os isolados que não cumpriam os critérios de inclusão supra mencionados, pela produção de outras  $\beta$ -lactamases.

### **Desenho metodológico do estudo**

Estudo retrospectivo e multicêntrico

### **Seleção da amostra**

Foram seleccionados 43 isolados de *Klebsiella pneumoniae* representativos das estirpes produtores da cefotaximase CTX-M-15 (n=16) identificadas em cinco hospitais (H1-H5) da região de Lisboa e na comunidade (n=1), bem como foram seleccionadas estirpes produtores da carbapenemase KPC-3 (n=27). As estirpes produtores de KPC-3 advêm todas do hospital H1 dada a ausência de identificação desta enzima em outras unidades hospitalares, à data de execução do presente estudo.

O método de amostragem utilizado foi a Amostragem Probabilística, nomeadamente a amostragem aleatória estratificada proporcional. Os estratos considerados foram a produção de CTX-M-15 e a produção de KPC-3. Para os isolados produtores de CTX-M-15 a selecção dos isolados foi efectuada através do programa *Excel Random Sample Software*.

### **Estudo 3.**

#### **População alvo**

A população alvo em estudo são estirpes de Gram-negativo com resistência fenotípica aos carbapenemos identificadas em Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde em ambiente hospitalar. Foram considerados como critérios de inclusão todas as estirpes Gram-negativas com resistência aos carbapenemos provenientes de um centro hospitalar terciário em Lisboa durante Abril de 2009 e Junho de 2011. Foram excluídos os isolados que não cumpriam os critérios de inclusão supra mencionados.

#### **Desenho metodológico do estudo**

Estudo prospectivo e unicêntrico

#### **Seleção da amostra**

No período decorrente de Abril de 2009 a Junho de 2011, foram identificados 40 isolados, nomeadamente *Klebsiella pneumoniae* (n=27), *Klebsiella oxytoca* (n=7), *Escherichia coli* (n=2), *Enterobacter aerogenes* (n=2), *Citrobacter freundii* (n=1) e *Acinetobacter baumannii* (n=1). Todos os isolados foram incluídos no estudo.



---

#### **Estudo 4.**

##### **População alvo**

A população alvo em estudo são estirpes de *Klebsiella pneumoniae* identificadas em Infecções do Trato Urinário na comunidade. Foram considerados como critérios de inclusão a identificação prévia da espécie *Klebsiella pneumoniae* e o isolamento ter ocorrido em laboratórios de análises clínicas da comunidade. Foram excluídos os isolados que não cumpriam os critérios de inclusão supra mencionados.

##### **Desenho metodológico do estudo**

Estudo retrospectivo e multicêntrico

##### **Seleção da amostra**

Foram seleccionados 50 isolados de *Klebsiella pneumoniae*, identificados entre Janeiro e Maio de 2010 em 10 laboratórios de análises clínicas dispersos pelo território nacional continental. O método de amostragem utilizado foi a Amostragem Probabilística, nomeadamente a amostragem aleatória simples, efectuada através do programa Excel Random Sample Software 7.0. Adicionalmente, os resultados foram comparados com isolados provenientes de Infecções do Trato Urinário identificadas em ambiente hospitalar, já caracterizados no Estudo 1. Foram considerados todos os isolados de *K. pneumoniae* da amostra biológica urina (n=32), com o objectivo de conhecer as características moleculares bacterianas em ambos os ambientes. Adicionalmente, por forma a comparar se existia um perfil de virulência específico associado à produção da mesma  $\beta$ -lactamase, os resultados dos isolados produtores de  $\beta$ -lactamases da comunidade foram também comparados com os isolados produtores de  $\beta$ -lactamases provenientes de ambiente hospitalar (n=100).

## II.2. Identificação e conservação dos isolados

A identificação dos isolados foi efectuada pelo sistema automatizado do Laboratório de Bacteriologia do centro hospitalar, bem como dos Laboratórios de Análises Clínicas da Comunidade, tendo sido posteriormente encaminhados para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Todos os isolados foram conservados a partir de uma cultura pura em criotubos com 1 mL de BHI com glicerol a 15%, devidamente identificados e conservados a -80°C. Deste modo, é possível preservar as características genotípicas e fenotípicas das bactérias, garantindo-se que as características permanecem intactas para estudos posteriores e diminuindo-se o risco de contaminação bacteriana e/ou fúngica comparativamente à conservação a temperatura ambiente.

## II.3. Caracterização fenotípica dos isolados

### Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos

Procedeu-se à determinação da suscetibilidade dos isolados a diferentes famílias de antibióticos recorrendo ao método de difusão de discos de antibiótico em agar, também designado Método de Kirby-Bauer, recorrendo ao meio Müller-Hinton agar (MHA) e discos dos antibióticos em estudo. Nos isolados do Grupo A foram estudados os perfis de suscetibilidade utilizando os antibióticos ampicilina (10µg), amoxicilina (10µg), estreptomicina (10µg), canamicina (30µg), cloranfenicol (30µg), tetraciclina (30µg) e sulfonamida (250µg), (BioRad). Em todos os isolados foi estudado o perfil de suscetibilidade aos antibióticos amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg), cefoxitina (30µg), cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg), imipenemo (10µg), ciprofloxacina (5µg) e gentamicina (10µg). Foram também determinados os

perfis de suscetibilidade aos antibióticos tigeciclina (15µg) e fosfomicina (200µg). De modo a ser possível identificar o perfil fenotípico dos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de Infecções do Trato Urinário adquiridas na comunidade (Estudo 4.) foram também incluídos discos de levofloxacina (5µg), nitrofurantoína (300µg) e trimetoprim/sulfametoxazol (1,25/23,75µg) (BioRad).

Os halos de inibição foram interpretados de acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)<sup>60</sup> e posteriormente analisados considerando os critérios do EUCAST<sup>61</sup> (Tabela 2). Os controlos de qualidade foram efectuados de acordo com critérios CLSI e EUCAST.<sup>60,62</sup> Para a fosfomicina, foram utilizados os critérios definidos nas normas da CLSI, validadas para os isolados de *E. coli* isolados em situação de infeções do trato urinário (ITU).<sup>60</sup> Os halos para a tigeciclina foram interpretados de acordo com o estabelecido pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).<sup>61</sup>

#### Determinação fenotípica de mecanismos específicos de resistência

Com o objectivo de identificar mecanismos específicos de resistência foram realizados ensaios com compostos inibidores. A cada disco de antibiótico utilizado no antibiograma foram adicionados 10 µL do agente inibidor. Quando positivo, na presença destes compostos verifica-se um aumento no diâmetro da zona de inibição de 5mm ou superior, em comparação com as zonas de inibição originais. A pesquisa de cefalosporinas AmpC foi realizada com a utilização de cloxacilina (10mg/mL) enquanto a detecção de metalo-β-lactamases e carbapenemases do Grupo A foi realizada com a adição de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e ácido borónico (20mg/mL), respectivamente.<sup>63,64</sup>

**Tabela 2.** Critérios de corte definidos pelo CLSI (2014) e EUCAST (2014) para testes de suscetibilidade antimicrobiana por método de difusão de discos.

| Agente Antimicrobiano           | CLSI (2014)                       |        |      | EUCAST (2014)                     |     |
|---------------------------------|-----------------------------------|--------|------|-----------------------------------|-----|
|                                 | Diâmetro da Zona de Inibição (mm) |        |      | Diâmetro da Zona de Inibição (mm) |     |
|                                 | S                                 | I      | R    | S ≥                               | R < |
| Ampicilina                      | ≥ 17                              | 14-16  | ≤ 13 | -                                 | -   |
| Amoxicilina                     | ≥ 17                              | 14-16  | ≤ 13 | -                                 | -   |
| Estreptomicina                  | ≥ 15                              | dez-14 | ≤ 11 | -                                 | -   |
| Canamicina                      | ≥ 18                              | 14-17  | ≤ 13 | -                                 | -   |
| Cloranfenicol                   | ≥ 18                              | 13-17  | ≤ 12 | -                                 | -   |
| Tetraciclina                    | ≥ 15                              | dez-14 | ≤ 11 | -                                 | -   |
| Sulfonamida                     | ≥ 17                              | 13-16  | ≤ 12 | -                                 | -   |
| Cefotaxima                      | ≥ 26                              | 23-25  | ≤ 22 | 20                                | 17  |
| Ceftazidima                     | ≥ 21                              | 18-20  | ≤ 17 | 22                                | 19  |
| Ciprofloxacina                  | ≥ 21                              | 16-20  | ≤ 15 | 22                                | 19  |
| Cefoxitina                      | ≥ 18                              | 15-17  | ≤ 14 | 19                                | 19  |
| Imipenemo                       | ≥ 23                              | 20-22  | ≤ 19 | 22                                | 16  |
| Gentamicina                     | ≥ 15                              | 13-14  | ≤ 12 | 17                                | 14  |
| Amoxicilina - Ácido Clavulânico | ≥ 18                              | 14-17  | ≤ 13 | 19                                | 19  |
| Fosfomicina                     | ≥ 16                              | 13-15  | ≤ 12 | -                                 | -   |
| Tigeciclina                     | -                                 | -      | -    | 18                                | 15  |

## II.4. Caracterização genotípica dos isolados

### Extração de DNA

Extraíu-se o DNA total de cada isolado pelo método de *boiling-centrifugation*, o qual consiste na lise de uma suspensão bacteriana densa em 1 mL de água bidestilada estéril, por fervura (95°C, 10 minutos), provocando desta forma a lise da parede celular e membrana, com a consequente libertação dos componentes celulares. Por centrifugação (12000 rpm, 4 minutos), removeram-se os resíduos celulares, recolhendo-se o sobrenadante. A conservação posterior foi efectuada a -20°C.

### Polymerase Chain Reaction (PCR)

O método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permite a amplificação específica de genes cuja presença se procura confirmar. O amplicão originado com os primers indicados é depois purificado, sequenciado e analisado. Esta reacção, requer uma extracção prévia do DNA das células, de forma a estar disponível para os *primers*, nucleótidos e DNA polimerase. As reacções de polimerase em cadeia foram realizadas utilizando o *kit* comercial *puReTaq Ready-To-Go PCR Beads* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose a 1%, em TAE (1x), e corados com GelRed (Biotium).

### Identificação dos determinantes genéticos de resistência

A presença de  $\beta$ -lactamases foi pesquisada através de reacções de PCR utilizando os *primers* já descritos na bibliografia para os genes de resistência que codificam para as  $\beta$ -lactamases: *bla*<sub>SHV</sub>,<sup>65</sup> *bla*<sub>DHA</sub>,<sup>66</sup> *bla*<sub>CTX<sub>M</sub></sub>,<sup>67</sup> *bla*<sub>KPC</sub>,<sup>68</sup> *bla*<sub>IMP</sub>,<sup>69</sup> *bla*<sub>VIM</sub>,<sup>70</sup> e *bla*<sub>OXA</sub>.<sup>24</sup> Os *primers* para os genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>NDM</sub> foram desenhados no laboratório de acordo com as sequências disponíveis no Genbank (HM749966 e

AB604954, respectivamente). As condições de PCR utilizadas, assim como os primers utilizados na pesquisa destas  $\beta$ -lactamases encontram-se descritos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Primers e condições de amplificação dos genes de resistência  $bla_{TEM}$  e  $bla_{NDM}$  desenhados em laboratório

| Gene        | Primers<br>5' - 3'       | Reacção por PCR         |                 |                               |                   |                           |
|-------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------|---------------------------|
|             |                          | Desnaturação<br>inicial | Nº de<br>ciclos | Ciclos                        | Extensão<br>final | Tamanho<br>fragmento (pb) |
| $bla_{TEM}$ | F: GAAAGGGCCTCGTGATAC    | 94º C                   | 35              | 94º C, 1min                   | 72º C             | 1058                      |
|             | R: TTACCAATGCTTAATCAGTGA | 3 min                   |                 | 56º C, 1 min<br>72º C, 1 min  | 9 min             |                           |
| $bla_{NDM}$ | F: TATCGCCGTCTAGTTCTGCTG | 94º C                   | 30              | 94º C, 45 seg                 | 72º C             | 871                       |
|             | R: ACTGCCCGTTGACGCCCAAT  | 3 min                   |                 | 59º C, 45 seg<br>72º C, 1 min | 10 min            |                           |

Legenda: F, primer forward; R primer reverse

#### Determinação do ambiente genético dos genes de resistência

Os genes de resistência aos antibióticos podem estar localizados em transposões e integrões. Desta forma, foi pesquisada a presença de integrões de classe I com primers e condições previamente descritos por Lévesque *et al.*, 1995.<sup>71</sup> Para esse efeito, amplificou-se a zona da cassette genética e as regiões conservadas 5' e 3' da cassette genética, a montante e jusante da mesma, respectivamente. A presença das sequências de inserção *ISEcp1* e *IS903*, frequentemente associadas ao gene  $bla_{CTX-M}$  foi também pesquisada.<sup>72</sup> Analisaram-se os produtos de PCR por electroforese em gel de agarose a 1% em TAE (1x), e procedeu-se à purificação e sequenciação dos mesmos. Foi também pesquisada a presença do transposição *Tn4401* usualmente associado ao gene  $bla_{KPC}$  através da identificação dos genes *tnpA* e

*ISKpn7* a montante e *ISKpn6* a jusante do gene. Os primers utilizados para amplificar os genes *tnpA* e *ISKpn6* foram os descritos por Naas *et al.*, 2008<sup>73</sup> enquanto os *primers* para identificar a presença do gene *ISKpn7* foram desenhados no laboratório, de acordo com as sequências disponíveis no Genbank (EU 176012.1).

#### Identificação dos grupos de incompatibilidade plasmídica

A identificação dos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos foi efectuada através da técnica de *Replicon Typing*, descrita por Carattoli *et al.*, 2005.<sup>48</sup> Esta técnica consiste na realização de reacções de PCR com *primers* específicos para origens de replicação de plasmídeos com diferentes grupos de incompatibilidade, nomeadamente: IncHI1, IncHI2, Inc1-ly, IncX, IncL/M, IncN, IncFIA, IncFIB, IncW, IncY, IncP, IncFIC, IncA/C, IncT, IncFIIA, IncK, IncK, IncB/O, IncF. As reacções de PCR foram realizadas utilizando o *Supreme NZYtaq Green Master Mix* (NZYTech), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose a 1%, em TBE (1x), corados com brometo de etídio, purificados utilizando o *Kit* comercial *JETquick Spin Column Technique* (Genomed®) segundo as instruções do fabricante e, posteriormente sequenciados.

#### Extracção de DNA plasmídico

Para a extracção de DNA plasmídico utilizou-se a técnica desenvolvida por Kado e Liu, 1981<sup>74</sup>, a qual consiste numa desnaturação do DNA cromossomal por lise alcalina utilizado SDS (dodecil sulfato de sódio), seguida de remoção de proteínas e outros compostos celulares por extracção com fenol-clorofórmio. O DNA plasmídico foi visualizado em gel de agarose a 0,7% em tampão TAE (1x) e corado com brometo de etídio. De seguida cortaram-se as bandas pretendidas do gel de agarose, purificaram-se e pesquisou-se a presença dos genes que codificam para as  $\beta$ -lactamases, previamente identificadas nos isolados.

### Identificação dos determinantes genéticos de virulência

Foi efectuada a pesquisa dos genes de virulência associados à *K. pneumoniae*, nomeadamente: *k2A* (antigénio capsular),<sup>75</sup> *khe* (hemolisina), *fimH* (proteína das fímbrias do tipo 1), *mrkDV1*, *mrkDV2*, *mrkDV3* e *mrkDV4* (adesinas das fímbrias do tipo 3) e *iucC* (sideróforo). Com excepção do *primer* para o gene *k2A*, os restantes foram desenhados no laboratório de acordo com as sequências disponibilizadas no Genbank: *khe* (NC\_012731.1), *fimH* (NC\_012731.1), *mrkDV1* (EU682505.2), *mrkDV2* (AY225463.1), *mrkDV3* (AY225464.1), *mrkDV4* (AY225465.1) e *iucC* (NC\_005249.1) (Tabela 4). Os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose a 1%, em TBE (1x), e corados com *GelRed* (Biotium), purificados utilizando o *Kit* comercial *JETquick Spin Column Technique* (Genomed®), segundo as instruções do fabricante, e posteriormente sequenciados.

**Tabela 4.** *Primers* e condições de amplificação dos genes de virulência desenhados em laboratório.

| Gene  | Primers<br>5' - 3'                                 | Reacção por PCR        |                 |  |                   |                           |
|---|--|------------------------|-----------------|--|-------------------|---------------------------|
|   |  | Desnaturaçã<br>inicial | Nº de<br>ciclos | Ciclos   | Extensão<br>final | Tamanho<br>fragmento (pb) |
| <i>khe</i>                                      | F: TGATTGCATTCGCCACTGG                             | 94º C<br>10 min        | 30              | 94º C, 30 seg                                  | 72º C             | 428                       |
|   | R: GGTCAACCCAACGATCCTGG                            |                        |                 | 60º C, 30 seg<br>72º C, 1 min                  | 10 min            |                           |
| <i>fimH</i>                                     | F: TGTTCAACACCTGCTGCTG                             | 94º C<br>10 min        | 30              | 94º C, 30 seg                                  | 72º C             | 512                       |
|   | R: CACCACGTCGTTTGTGGCGT                            |                        |                 | 61º C, 30 seg<br>72º C, 1 min                  | 10 min            |                           |
| <i>mrkDV1</i>                                   | F: CGGTGATGCTGGACATGGT                             | 94º C<br>10 min        | 30              | 94º C, 30 seg                                  | 72º C             | 300                       |
|   | R: CYTCSAGSGAATAGTTGGTG                            |                        |                 | 60º C, 30 seg<br>72º C, 1 min                  | 10 min            |                           |
| <i>mrkDV2</i><br><i>mrkDV3</i><br><i>mrkDV4</i> | F: CTTRATGGCGMTGGGSACCA<br>R: TCATRTGCGAYTCCACCTCR | 94º C<br>10 min        | 30              | 94º C, 30 seg<br>61º C, 30 seg<br>72º C, 1 min | 72º C<br>10 min   | 950                       |
| <i>iucC</i>                                     | F: GTGCTGTCGATGAGCGATGC                            | 94º C<br>10 min        | 30              | 94º C, 30 seg                                  | 72º C             | 944                       |
|   | R: GTGAGCAGGTTTCAGCGTC                             |                        |                 | 62º C, 30 seg<br>72º C, 1 min                  | 10 min            |                           |

Legenda: F, *primer forward*; R *primer reverse*



---

### Purificação dos produtos de PCR e do DNA extraído do gel de agarose

Os produtos de PCR e o DNA extraído do gel de agarose foram purificados através do kit NZY Gelpure (Nzytech genes & enzymes).

### Sequênciação e análise das sequências nucleotídicas

Para completar a caracterização genética das bactérias é necessário sequenciar os produtos obtidos na amplificação por PCR. Sendo a sequenciação um processo complexo e muito sensível é necessário garantir que a solução a analisar contém apenas o DNA pretendido. Deste modo, as amostras foram purificadas utilizando-se o Kit de purificação *JETquick Spin Column Technique* (Genomed®), segundo as instruções do fabricante. Ambas as cadeias foram sequenciadas pelo serviço da MacroGen Korea. A análise das sequências nucleotídicas amplificadas pelo método de PCR foi efectuada recorrendo a dois programas informáticos: BLAST e CLUSTALW.

O programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) permite a análise das sequências nucleotídicas obtidas considerando a homologia com as contidas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), permitindo conhecer a significância estatística dos emparelhamentos.

O Software ClustalW Multalign é um programa de alinhamento de múltiplas sequências, para DNA e proteína, disponível online ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)). Produz alinhamentos de várias sequências divergentes, de forma biologicamente relevante. Calcula o melhor emparelhamento possível entre cada sequência, e fornece um *output* alinhado para que as identidades, semelhanças e diferenças possam ser visíveis.

Por forma a proceder à caracterização clonal e avaliar a relação clonal dos isolados recorreu-se ao método genotípico M13 PCR fingerprinting, baseado na técnica de *Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis* (RAPD).

#### Tipificação dos isolados bacterianos por M-13 PCR fingerprinting

O método de M-13 PCR fingerprinting é de fácil realização e, embora tenha sido descrita baixa reprodutibilidade inter-ensaios, tem sido amplamente utilizado neste laboratório para tipificar diversos microrganismos, encontrando-se descrita uma boa correlação com outros métodos. Para extrair o DNA de cada isolado recorreu-se à técnica por boiling (já descrita no Estudo 1), menos dispendiosa que o recurso a Kits de extracção comerciais e mais rápida que a extracção por fenol: clorofórmio e precipitação com etanol absoluto. Para a amplificação recorreu-se às Ready-to-go™ RAPD Analysis Beads (GE Healthcare®), de acordo com as instruções do fabricante. Os termocicladores utilizados foram os Biometra® T-Personal e T-Gradient. Os primers e as condições de PCR usadas foram descritas por Grundmann *et al.*, 1997. A análise dos perfis de *fingerprinting* foi efectuada em gel de agarose a 2%, em TBE (1x) (Tris 45mM, ácido borónico 45mM, EDTA 1mM), corado com brometo de etídio.

#### Multilocus Sequence Typing (MLST)

A técnica de MLST baseia-se na sequenciação de fragmentos internos de múltiplos genes nativos de uma dada espécie (genes *housekeeping*), sendo depois as sequências submetidas a uma base de dados única, disponível *online*, da qual resulta a atribuição de um código alélico único a cada sequência. A combinação do perfil alélico assim obtido para os genes analisados corresponde a um *sequence-type*, que individualiza um isolado<sup>4</sup>. Esta técnica revela a estrutura clonal e uma filogenia subjacente que não é revelada por electroforese de campo pulsado, um método mais adequado para a investigação de surtos a curto prazo<sup>76</sup>.

Foram utilizadas *Pure Taq Ready-To-Go PCR Beads<sup>TM</sup>* (GE Healthcare) para amplificar os sete genes *housekeeping*: *gapA* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *infB* (factor 2 de iniciação da tradução), *mdh* (malato desidrogenase), *pgi* (fosfoglucoase isomerase), *phoE* (fosfoporina E), *rpoB* (subunidade  $\beta$  da RNA polimerase B) e *tonB* (transdutor energético periplasmático). Os primers e condições de PCR foram descritos por Diancourt *et al.*, 2005<sup>77</sup>. Os produtos foram purificados e sequenciados após corrida em gel de agarose a 1% em TAE (1x) (Tris 40mM, ácido acético 20mM, EDTA 1mM), e coloração com brometo de etídio. As sequências nucleotídicas obtidas permitiram definir os alelos de cada *locus* e, de acordo com a combinação de alelos de cada isolado, foram identificados os *Sequence Types* (STs) através da base de dados do Instituto Pasteur ([www.pasteur.fr/mlst](http://www.pasteur.fr/mlst)).

## II.5. Métodos Estatísticos

O tratamento estatístico dos resultados foi processado em suporte informático pelo programa *Microsoft Office Excel 2007*. De modo a perceber o significado estatístico das comparações efectuadas ao longo do presente estudo foi efectuado o Teste de Fisher Exacto, para o qual se recorreu ao programa de cálculo disponível em <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index>. Os resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.



### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO



**Estudo 1.** Caracterização fenotípica e genotípica dos determinantes de resistência e virulência em isolados de *Klebsiella* spp. multiresistentes de um centro hospitalar de cuidados terciários em Lisboa, durante 31 anos consecutivos.

**Estudo 1.** Caraterização fenotípica e genotípica dos determinantes de resistência e virulência em isolados de *Klebsiella* spp. multiresistentes de um centro hospitalar de cuidados terciários em Lisboa, durante 31 anos consecutivos.

As Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (IACS) por estirpes de *Klebsiella* spp. constituem um importante problema de Saúde Pública, sendo o conhecimento destes isolados e sua caraterização epidemiológica um factor chave para o combate à resistência aos antibióticos à sua disseminação. Neste sentido, são apresentados e discutidos os resultados referentes ao Estudo 1.

### III.1. Caraterização da amostra

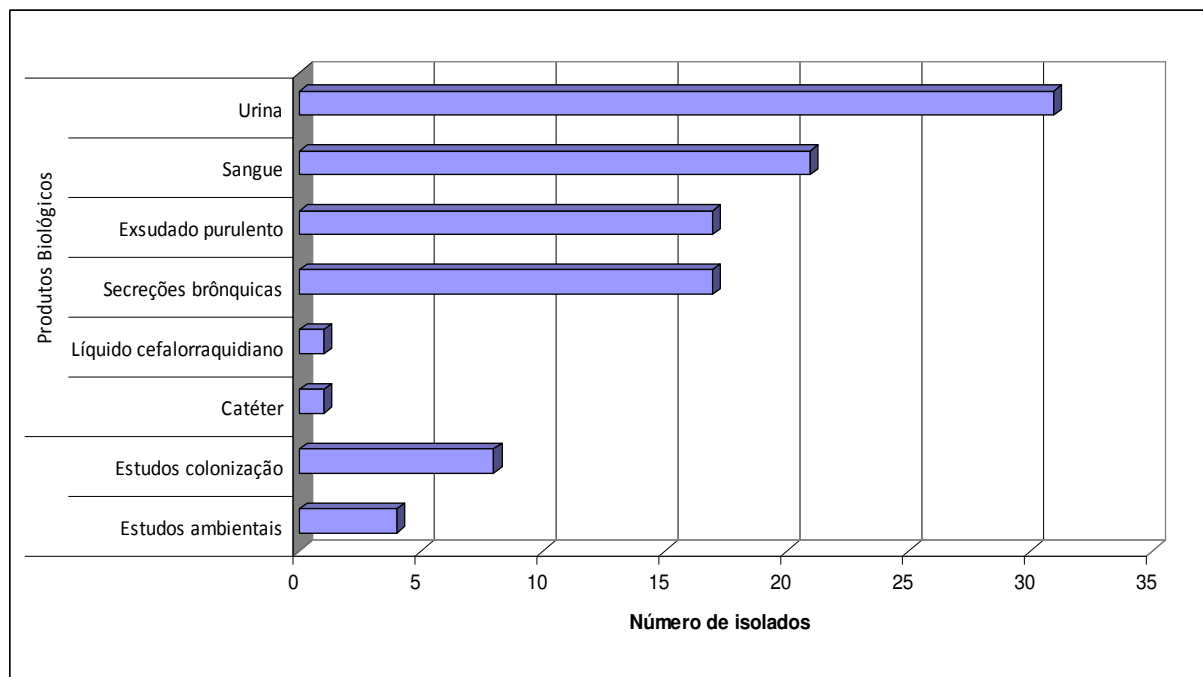
A amostra foi seleccionada de acordo com o perfil fenotípico e categorizada em quatro Grupos (A-D), sendo estes coincidentes com os anos de isolamento 1980 a 1989 (Grupo A), 1990-2001 (Grupo B), 2002-2008 (Grupo C) e 2009-2011 (Grupo D), apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Categorização dos isolados em estudo de acordo com o ano de identificação.

| Grupo | Ano de Isolamento | Colecção de estirpes em estudo<br>nº de isolados |
|-------|-------------------|--|
| A     | 1980-1989         | 15   |
| B     | 1990-2001         | 12   |
| C     | 2002-2008         | 46   |
| D     | 2009-2011         | 27   |
| TOTAL |                   | 100  |



Na Figura 5 é apresentada a distribuição das estirpes de *Klebsiella pneumoniae* (n=100) pelos produtos biológicos nos quais foram identificados.



**Figura 5.** Proveniência dos isolados hospitalares de *K. pneumoniae*: produtos biológicos, estudos de colonização e ambientais.

Todos os isolados são provenientes de produtos biológicos, com excepção de 12 isolados do Grupo A, sendo 4 de estudos ambientais e 8 de colonização. Os restantes 88 são provenientes de urina (31/88, 35,2%), sangue (21/88, 23,9%), exsudado purulento (17/88, 19,3%), secreções brônquicas (17/88, 19,3%), líquido cefalorraquidiano (1/88, 1,14%) e catéter (1/88, 1,14%). A caracterização efectuada é coincidente com o facto de a *K. pneumoniae* ser um dos microrganismos, após a *E. coli*, mais frequentemente associado à etiologia microbiana das infeções das vias urinárias.<sup>78-80</sup> É também um dos cinco microrganismos mais frequentemente isolado em situações de bacteriémia e infeções respiratórias, como pneumonias.<sup>7</sup>

### **Grupo A**

Os isolados identificados entre 1980 e 1989 (Grupo A) são provenientes de um estudo de colonização efetuado em recém-nascidos, o qual conduziu à tese da Tese de Doutoramento da Professora Doutora Aida Duarte, orientadora da presente tese. Dos 15 isolados do grupo A, 12 são provenientes de colheitas efetuadas a recém-nascidos (n=7), no meio ambiente (n=4) e a uma enfermeira (n=1) do Serviço de Internamento de Neonatologia. Os restantes isolados (n=3) são provenientes da Unidade de Reanimação de doentes politraumatizados do Hospital de São José (atualmente Centro Hospitalar Lisboa Central), cuja inclusão se justifica por se tratarem de isolados identificados em hospedeiros adultos no mesmo período de tempo que os isolados do Centro Hospitalar terciário em Lisboa.

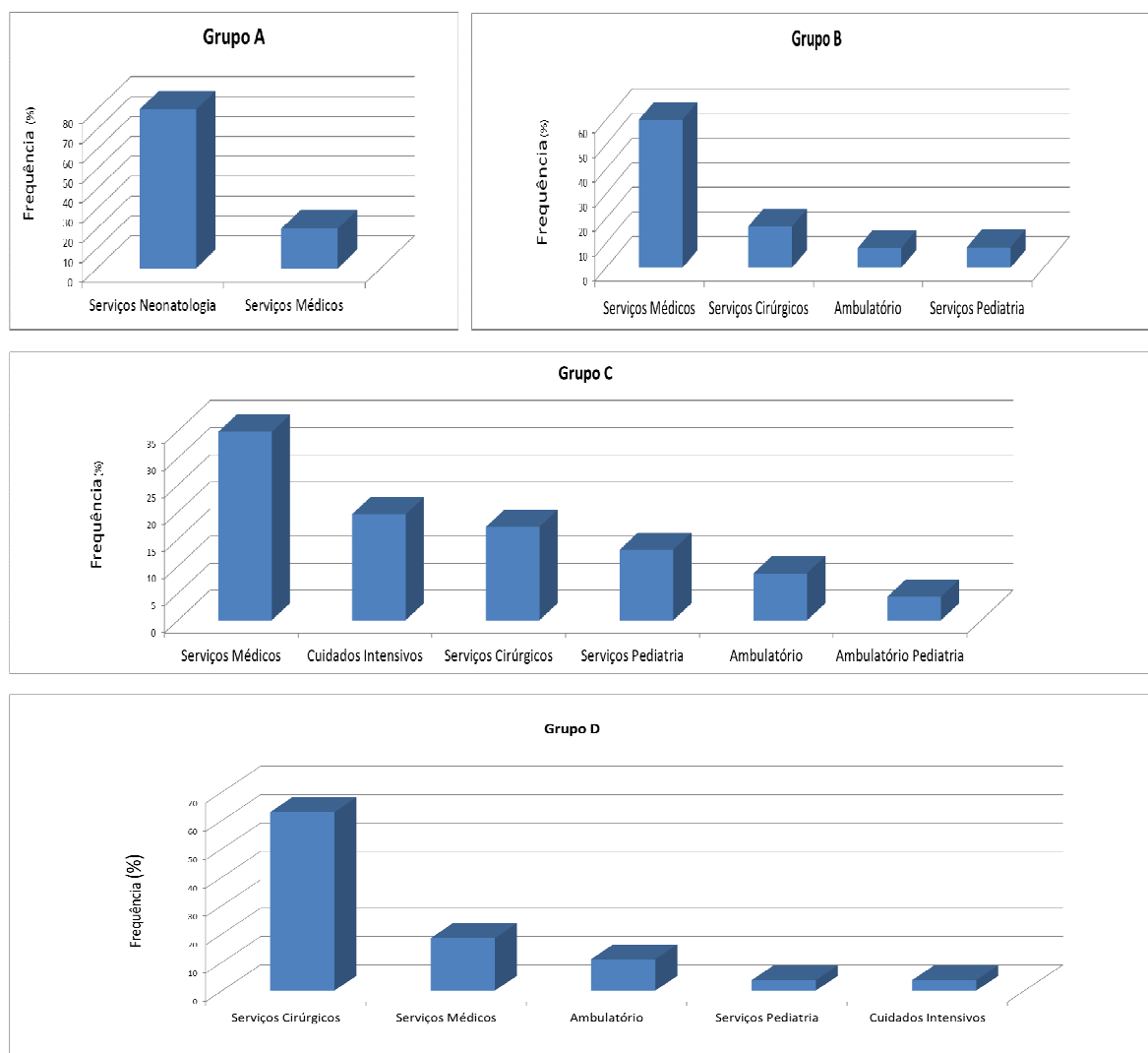
### **Grupos B, C e D**

Os isolados dos Grupos B a D foram identificados entre 1990 e 2013 pelo Serviço de Patologia Clínica, tendo sido posteriormente encaminhados para o Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para execução de estudos mais detalhados. Os 12 isolados do Grupo B (1990 a 2001) provêm de urinas (n=8), sangue (n=2), secreções brônquicas (n=1) e catéter (n=1). Por sua vez, os 46 isolados do Grupo C (2002 a 2008) foram identificados nos seguintes produtos biológicos: sangue (n=13), urina e secreções brônquicas (n=11), exsudado purulento (n=10) e líquido cefalorraquidiano (n=1). Finalmente, os 27 isolados do Grupo D (2009 a 2013) foram identificados em amostras de urina (n=10), sangue (n=6), exsudado purulento (n=7) e secreções brônquicas (n=4).

### **Caraterização dos serviços clínicos**

De forma a completar a caraterização da amostra em estudo, importa verificar a frequência de distribuição dos isolados pela tipologia de serviço prestado e ano de isolamento. A identificação dos

serviços clínicos permite não só verificar a possibilidade de existência de clones endêmicos, assim como implementar medidas específicas e adequadas a cada realidade clínica. Os resultados são apresentados na Figura 6.



**Figura 6.** Frequência de distribuição dos isolados de *K. pneumoniae* por tipologia de serviço clínico.

A amostra do Grupo A foi identificada majoritariamente (80,0%; 12/15) no serviço de Neonatologia, nomeadamente na Unidade de Cuidados Intermédios e Intensivos de Neonatologia. No Grupo B verifica-

se que 58,3% da amostra (7/12) foi identificada de forma mais frequente em serviços Médicos. Estes mesmos serviços são comuns ao Grupo C (19,6%; 9/46), embora a dispersão hospitalar dos isolados deste Grupo se tenha verificado mais acentuada dado que compreende 22 serviços clínicos distintos do Hospital. Por sua vez, os isolados do Grupo D foram identificados predominantemente em Serviços Cirúrgicos (63,0%), sendo que 11,1% dos isolados (3/27) foram identificados em regime de ambulatório, embora associados ao seguimento dos doentes após intervenção cirúrgica.

A amostra representativa dos isolados identificados entre 1990 e 2008 denota uma predominância de *K. pneumoniae* nos Serviços de Medicina. Estes resultados podem ser explicados pela cronicidade da patologia dos doentes, o estado de não competência do sistema imunitário e pela frequente existência de dispositivos médicos invasivos associados a estes serviços hospitalares.<sup>23</sup> Por sua vez, a amostra de isolados identificados a partir de 2009 são maioritariamente provenientes de serviços cirúrgicos comparativamente às medicinas. Dada a utilização de procedimentos invasivos que implicam rupturas da barreira cutâneo-mucosa, os factores exógenos sobrepõem-se aos factores endógenos na predisposição para a infecção associada a procedimentos cirúrgicos. De acordo com a literatura, cerca de 80% das IACS têm origem na flora comensal, sobretudo muco-cutânea, do doente.<sup>81</sup>

Nos últimos anos do estudo, verificou-se um aumento no isolamento de *K. pneumoniae* multiresistente nos Serviços Cirúrgicos (1990-2008, 17% Vs 2009-2011, 59%). Estudos de caracterização molecular de *K. pneumoniae* em doentes submetidos a transplante renal indicam colonização prévia à admissão hospitalar e promovem a discussão da implementação da antibioterapia prévia a procedimentos cirúrgicos.<sup>82</sup> A Norma de Profilaxia Antibiótica Cirúrgica (Norma Nº 031/2013), actualizada em Dezembro de 2014, estabelece claramente que não há qualquer razão para profilaxias antibióticas cirúrgicas com duração superior a 24 horas e que a esmagadora maioria requer apenas uma dose, habitualmente, nos

60 minutos que antecedem a cirurgia.<sup>40</sup> No entanto, em dois terços dos doentes submetidos a cirurgia o antibiótico de profilaxia é prolongado para além das 24 horas,<sup>83</sup> situação que potencia o efeito de pressão terapêutica nos isolados multirresistentes.

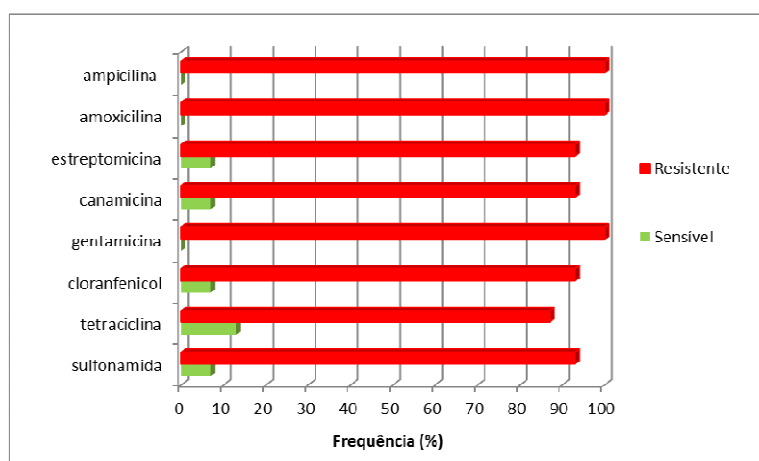
## III.2. Caracterização fenotípica: perfil de suscetibilidade

A terapêutica empírica para infeções severas deve ser recomendada tendo por base a distribuição dos microrganismos e o seu perfil de suscetibilidade na instituição onde o regime é administrado, de modo a reduzir a possibilidade e consequências de uma terapêutica inapropriada. Torna-se, assim, imperativo o seu conhecimento assim como o estudo da sua evolução ao longo dos anos.

### III.2.1. Suscetibilidade a antibióticos

Considerando a antiguidade dos isolados do Grupo A (1980-1989), importa efectuar a verificação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos utilizados nessa época. Assim, na Figura 7 encontra-se representado o comportamento aos antibióticos mais frequentes na prática clínica dos anos 80, nomeadamente: ampicilina e amoxicilina, estreptomicina, canamicina, gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina e sulfonamida.

Pela análise do Gráfico da Figura 7, verifica-se que 93,3% (14/15) dos isolados são resistentes aos aminoglicosídeos canamicina e estreptomicina, assim como à sulfonamida e clorafenicol. Por sua vez, 87,0% (13/15) são resistentes à tetraciclina enquanto todos os isolados apresentaram resistência à gentamicina, ampicilina e amoxicilina.

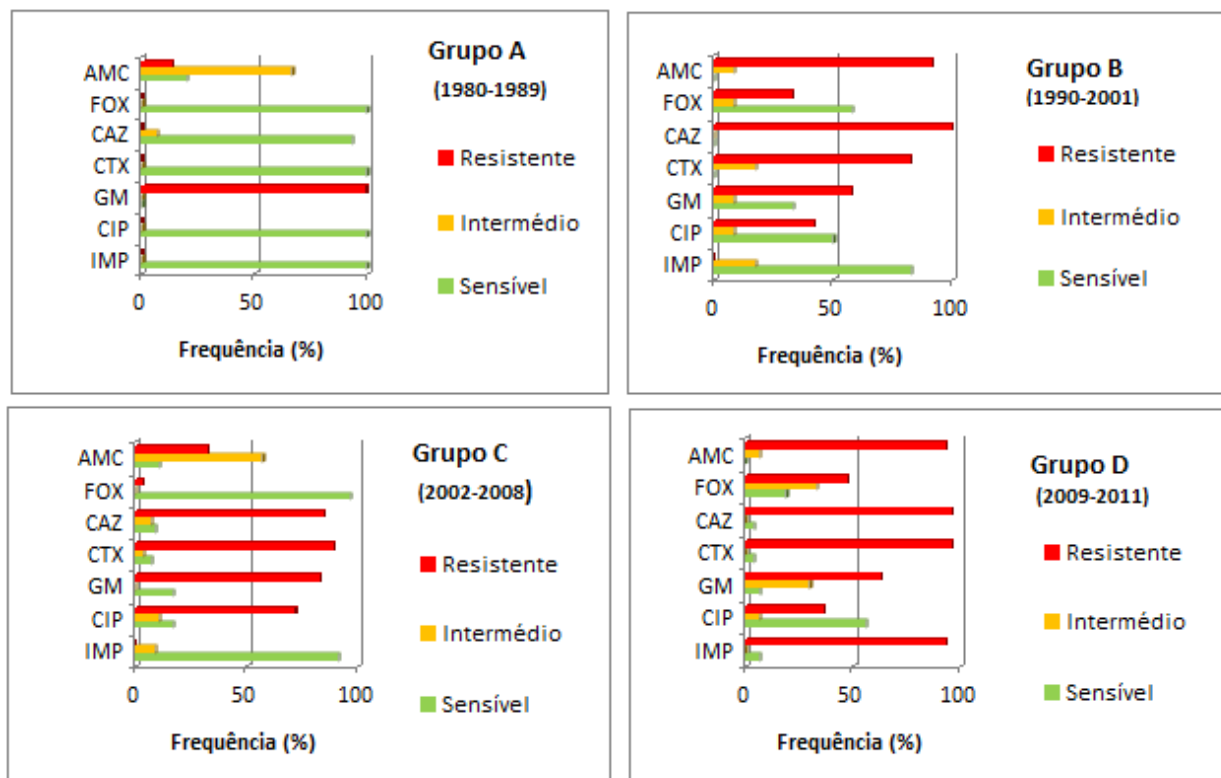


**Figura 7.** Perfil de suscetibilidade dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* do Grupo A (1980-1989) aos antibióticos mais frequentemente utilizados nos anos 80.

De forma a uniformizar os resultados obtidos no estudo da suscetibilidade aos antibióticos para os Grupos B, C e D, foi realizado o mesmo antibiotipo para todos os isolados dos Grupos A-D. Os antibióticos estudados foram a associação de um  $\beta$ -lactâmico com inibidor de  $\beta$ -lactamases (amoxicilina - ácido clavulânico); cefalosporinas de 2ª e 3ª geração (cefotaxima, ceftazidima e cefotaxima); quinolonas (ciprofloxacina), aminoglicosídeos (gentamicina) e carbapenemos (imipenemo). Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com os valores recomendados pelo CLSI (2014) e são apresentados na Figura 8.

Os isolados do Grupo A (1980-1989), os quais apresentavam um perfil de multirresistência para os antibióticos utilizados nos anos 80 (Figura 7) demonstram suscetibilidade de 100,0% (15/15) para a cefotaxima, cefotaxima, ciprofloxacina e imipenemo. 93,3% (14/15) dos isolados apresentam suscetibilidade para a ceftazidima enquanto uma suscetibilidade intermédia de 66,7% (10/15) foi identificada para a amoxicilina-ácido clavulânico, com 2 isolados a apresentar resistência a este antibiótico (13,3%; 2/15). Entre ambos os antibiogramas, manteve-se o perfil de resistência à

gentamicina (100,0%; 15/15), como esperado. A suscetibilidade superior a 90% às cefalosporinas ceftazidima, ceftaxima e cefotaxima, bem como à fluoroquinolona ciprofloxacina, poderão ser explicados pelo facto da introdução destes antibióticos em Portugal, ter ocorrido no final dos anos 80 como consequência da ineficácia clínica, pelo perfil de resistência, às penicilinas (amoxicilina e ampicilina) e aminoglicosídeos (estreptomicina, canamicina e gentamicina) utilizados até então.



**Figura 8.** Perfil de suscetibilidade dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* do Grupo A, B, C e D a um antibiótico comum. Legenda: AMC- amoxicilina-ácido clavulânico; FOX-cefoxitina; CAZ- ceftazidima; CTX- cefotaxima; GM- gentamicina; CIP-ciprofloxacina; IMP-imipenemo

Quando se comparam os resultados obtidos ao longo do tempo (Figura 8), verifica-se uma importante evolução do perfil de resistência dos isolados de *K. pneumoniae* desde 1980 até 2011. A resistência à amoxicilina-ácido clavulânico aumentou de 13,3% (2/15) no Grupo A para 92,6% (25/27) no Grupo D. A

resistência às cefalosporinas de terceira geração, ceftazidima e cefotaxima variou entre 0% no Grupo A (0/15) e 96,3% no Grupo D (26/27). No que infere à ciprofloxacina foi verificado uma resistência de 0% (0/15), 41,7% (5/12), 71,7% (33/46) e 37,04% (10/27) e para a gentamicina 100% (15/15), 58,3% (7/12), 82,6% (38/46) e 63,0% (17/27) para os Grupo A (1980-1989), B (1990-2001), C (2002-2008) e D (2009-2011), respectivamente. 92,59% (25/27) da amostra de *K. pneumoniae* identificada entre 2009-2011 apresentou resistência ao imipenemo, comparativamente a 0% nos Grupos A, B e C.

Um factor a ter em conta na seleção e disseminação de isolados responsáveis por infeções associadas aos cuidados de saúde é o consumo de antimicrobianos em ambiente hospitalar.<sup>33,44</sup> O Projeto de Vigilância Europeu “European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network”(ESAC) apresenta os dados do consumo médio europeu de antimicrobianos de uso sistémico do sector hospitalar. O relatório publicado em 2014 com dados referentes a 2012, aponta para consumos em Portugal de 1,46 DDD por 1000 habitantes/dia,<sup>84</sup> valor igual a 2011<sup>44</sup> e inferior ao consumo médio da União Europeia (2,01 DDD por 1000 habitantes/dia). Note-se, no entanto, que os dados de Portugal reflectem apenas os consumos do sector hospitalar público.<sup>84</sup>

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos representam 65% do consumo de antibióticos em ambiente hospitalar em Portugal (0,95 DDD por 1000 habitantes/dia), em especial as penicilinas de forma isolada ou combinada com inibidores enzimáticos (0,51 DDD por 1000 habitantes/dia). Em sete países (Bulgária, Croácia, Itália, Luxemburgo, Malta, Eslováquia e Portugal) estas combinações representam mais de 75% do consumo de penicilinas. No presente estudo a amostra seleccionada entre 2009 a 2011 apresentava um perfil de resistência à amoxicilina-ácido clavulânico em 93% dos isolados, pelo que a sua utilização terapêutica a nível hospitalar deverá, preferencialmente, ser recomendada após confirmação da suscetibilidade.



Verificou-se uma tendência crescente na resistência à ciprofloxacina até 2008 (0%, 41,7% e 71,7%), que decresce nos isolados identificados entre 2009 e 2011 (37,0%). Estes resultados podem ser explicados por uma alteração no perfil de prescrição, com consequente diminuição da pressão selectiva. O consumo de quinolonas em 2012 representa 6,2% do consumo hospitalar de antibióticos em Portugal. Juntamente com a Noruega, Portugal apresentou o consumo mais baixo da União Europeia (0,09 DDD por 1000 habitantes/dia), cujos consumos médios foram de 0,28 DDD por 1000 habitantes/dia, sendo a Itália o país com superior consumo (0,44 DDD por 1000 habitantes/dia).<sup>84</sup>

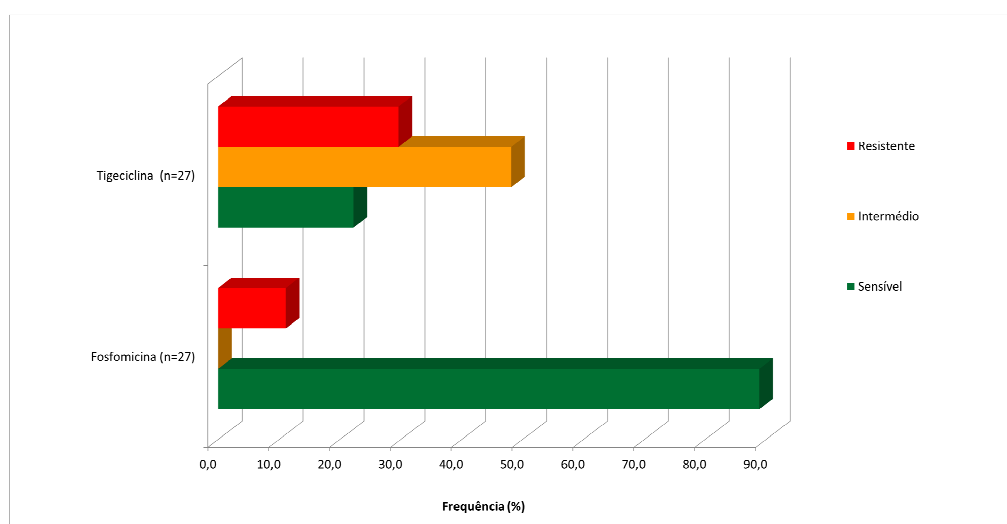
De acordo com a informação pública disponibilizada pela Autoridade Nacional da Saúde e do Medicamento – Infarmed, o primeiro registo de Autorização de Introdução no Mercado (AIM) de imipenemo em Portugal data de 1986. No entanto, o primeiro genérico foi autorizado no ano de 2008 e no período 2009-2011 foram concedidas 9 das 11 autorizações que se mantêm actualmente.<sup>85</sup> Em linha com estes dados, no ano de 2011 já se verificavam tendências crescentes de consumo de carbapenemos (grupo ATC J01DH) em Portugal.<sup>44</sup> Em 2012, Portugal apresenta os consumos mais elevados de toda a União Europeia (0,14 DDD por 1000 habitantes por dia em Portugal), de acordo com o Relatório “Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012,” do *European Centre for Disease Prevention and Control*.<sup>84</sup> Também considerando a proporção do consumo de carbapenemos no total de antibióticos para uso sistémico os valores reportados a nível europeu para o consumo hospitalar, em 2012, variaram entre 0,8% (Lituânia) e 9,8% (Portugal), sendo o valor médio na União Europeia de 2,9%.<sup>84</sup> Em 2013, o ECDC reporta uma prevalência de isolados resistentes aos carbapenemos em Portugal inferior a 2%,<sup>33</sup> valor que se pode considerar redutor se considerarmos o baixo número de unidades hospitalares que reportaram nos seus dados. Note-se, que dados nacionais do Infarmed, de 2014, confirmam a tendência crescente do consumo de carbapenemos, não obstante a diminuição de 2% no consumo hospitalar anual de antibacterianos em Portugal.<sup>40</sup> De facto, o aumento de isolados resistentes a este grupo de

antibióticos diminuem consideravelmente as opções disponíveis para o tratamento antimicrobiano das infeções por *Enterobacteriaceae*,<sup>78</sup> pelo que os resultados do presente trabalho revelam a importância de monitorizar o crescente consumo e as taxas de resistência aos carbapenemos assim como se deverá promover acções de sensibilização aos prescritores para que a utilização destes antibióticos seja restrita em infeções severas com microrganismos multirresistentes.

A resistência antimicrobiana em isolados de *K. pneumoniae* é um problema com importância crescente em todo o Mundo.<sup>33,86,87</sup> No primeiro relatório sobre esta temática a nível mundial, publicado em 2014, a Organização Mundial de Saúde (OMS) alerta para o facto de as infeções consideradas atualmente como menores poderem voltar a matar se nada for feito para lutar contra a resistência aos antibióticos, afirmando que esta grave ameaça é já uma realidade. O relatório apresenta dados de 114 países e centra-se na resistência aos antibióticos dos sete principais microrganismos que representam risco para a saúde pública e cujo conhecimento deve ser potenciado, nos quais se inclui a *K. pneumoniae*.<sup>34</sup> Este cenário assume especial relevância também pelo reduzido número de novos antibióticos em estudo ou em fase de desenvolvimento mais avançado,<sup>34,88,89</sup> assim como pelos resultados obtidos em isolados multiresistentes,<sup>90</sup> o que levou a OMS a publicar uma listagem de microrganismos prioritários em 2017, destacando a *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase como prioridade crítica.<sup>91</sup>

### III.2.2. Suscetibilidade à tigeciclina e fosfomicina

Actualmente, novas estratégias terapêuticas para infeções com isolados resistentes aos carbapenemos têm que ser encontradas. Dentro das limitadas opções disponíveis, poder-se-à considerar a fosfomicina ou tigeciclina.<sup>92</sup> Importa, assim determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados do Grupo D a opções terapêuticas como a tigeciclina e a fosfomicina. A selecção deste grupo prende-se com o facto de serem os isolados com maior taxa de resistência aos antibióticos estudados. Os resultados são apresentados na Figura 9.



**Figura 9.** Perfil de suscetibilidade dos isolados hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* do Grupo D (2009-2011) aos antibióticos fosfomicina e tigeciclina. Legenda: AMC amoxicilina-ácido clavulânico; C3G cefalosporinas de terceira geração; GM gentamicina; CIP ciprofloxacina; IMP imipenemo

A Figura 9 representa o perfil de suscetibilidade dos isolados do Grupo D aos antibióticos tigeciclina e fosfomicina. Os resultados obtidos com a tigeciclina apontam para uma suscetibilidade de 22,2% (6/27), suscetibilidade intermédia de 48,1% (13/27) e resistência de 29,6% (8/27). Por sua vez, 11,1% dos isolados (3/27) são resistentes à fosfomicina e 88,9% (24/27) são susceptíveis a este antibiótico. Não

foram identificados isolados com perfil de suscetibilidade intermédia à fosfomicina.

A emergência e disseminação de bactérias resistentes a distintas classes de antibióticos vêm tornar ainda mais complexo o tratamento de infeções severas causadas por estas bactérias.<sup>44</sup> A evidência científica suporta a utilização clínica de fosfomicina no tratamento de infeções urinárias complicadas e não complicadas do trato urinário inferior, sendo efectiva em infeções urinárias causadas por isolados de *E. coli*,<sup>93,94</sup> incluindo produtores de ESBL.<sup>92</sup> Keating, G.M. (2013) menciona que uma dose única de fosfomicina oral deve ser considerada como uma opção de primeira linha para o tratamento empírico de ITU não complicadas do trato urinário inferior e que este antibiótico demonstrou boa actividade para estirpes uropatogénicas como *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *K. pneumoniae*, com uma suscetibilidade que se manteve estável ao longo do tempo.<sup>93,94</sup> Falagas *et al.* (2010) avaliaram a fosfomicina como opção terapêutica para infeções urinárias causadas por *Enterobacteriaceae* com perfil de multiresistência, determinando que 81% dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL demonstraram suscetibilidade à fosfomicina.<sup>95</sup> No entanto, a utilização da fosfomicina em isolados de *K. pneumoniae* multiresistentes ou produtores de ESBL não é consensual.<sup>96</sup> Outros autores reportam reduzida actividade em produtores de ESBL, embora concluem ser uma eficaz alternativa terapêutica para os isolados resistentes à ciprofloxacina<sup>97</sup> e aos carbapenemos.<sup>92</sup> A elevada suscetibilidade determinada no presente estudo (>85%) demonstra que a fosfomicina apresenta promissora atividade *in vitro* quando utilizada em isolados de *K. pneumoniae* multiresistentes a antibióticos, incluindo nos isolados simultaneamente resistentes à gentamicina, ciprofloxacina e ao imipenemo (>75%). No entanto, importa monitorizar o comportamento *in vivo* dos isolados em situações de terapêutica com o antibiótico fosfomicina dado que foi já reportada na literatura divergência entre a suscetibilidade *in vitro* (92%) e eficácia *in vivo* (46%).<sup>94</sup>

Na Europa, a tigeciclina (Grupo ATC J01AA12) encontra-se aprovada para o tratamento de infeções

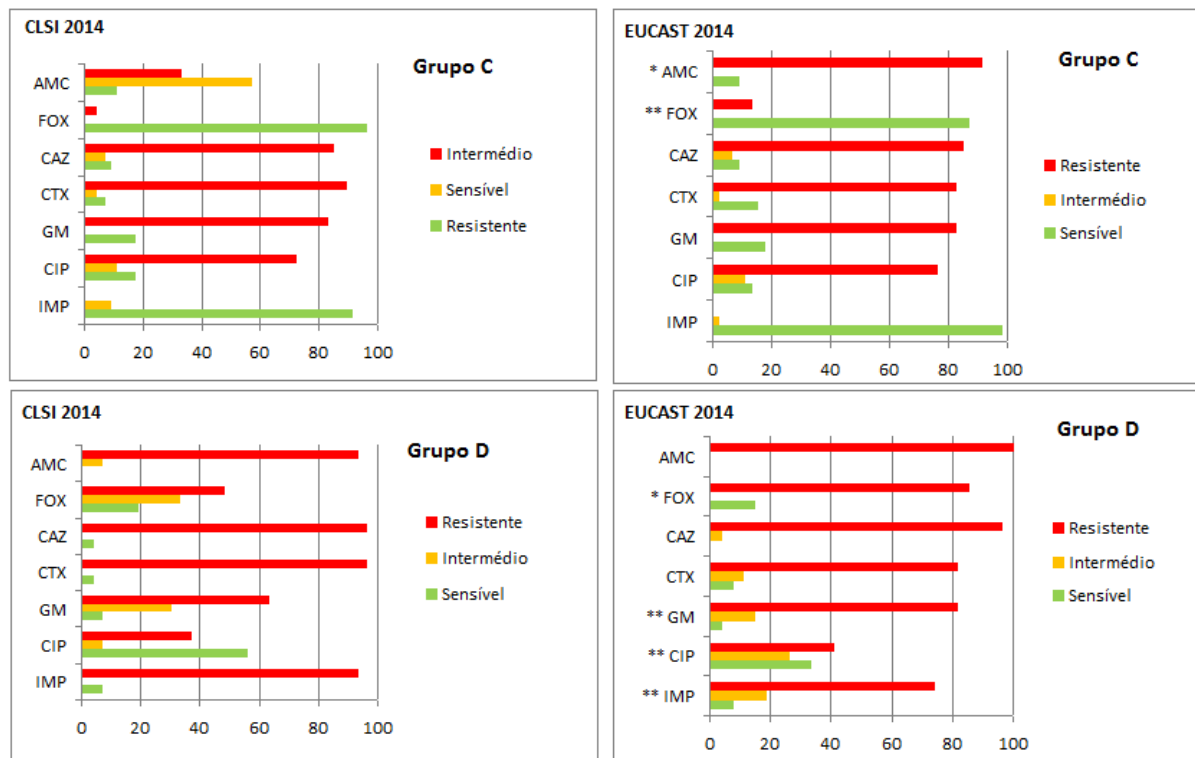
complicadas intra-abdominais, da pele e tecidos moles, devendo ser utilizada somente quando outros antibióticos não são adequados.<sup>98</sup> Nos Estados Unidos, por sua vez, é também aprovada para o tratamento de pneumonia adquirida na comunidade.<sup>92</sup> O primeiro reporte sobre a ocorrência de bacterémia por isolados não susceptíveis à tigeciclina é reportada em *Acinetobacter baumannii*, em 2007.<sup>99</sup> Posteriormente, vários autores reportaram resistência a este antibiótico, principalmente em *A. baumannii* e *K. pneumoniae*.<sup>100-102</sup> No presente estudo 30% dos isolados resistentes aos carbapenemos são também resistentes à tigeciclina e 48% apresentam suscetibilidade intermédia a este antibiótico. Estes resultados, analisados conjuntamente, indicam que a utilização clínica da tigeciclina em isolados resistentes aos carbapenemos, mesmo em infeções complicadas, deverá ser efectuada de forma prudente, de forma a prevenir a ocorrência de resistência durante o tratamento, pela pressão terapêutica.<sup>103</sup>

### III.2.3. Suscetibilidade de acordo com critérios CLSI e EUCAST

O presente trabalho considerou os critérios de interpretação dos testes de sensibilidade para as *Enterobacteriaceae* do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).<sup>60</sup> No entanto, pretendeu-se comparar o impacto da alteração dos critérios quando utilizados os definidos pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).<sup>61</sup> Na Figura 10 são apresentados os resultados obtidos com os isolados com maior resistência aos antibióticos (Grupos C e D).

Quando utilizados os valores recomendados pelo EUCAST para os antibióticos em estudo foram identificadas variações significativas no perfil de resistência dos isolados do Grupo C (2002-2008) à amoxicilina-ácido clavulânico (resistência de 32,6% CLSI Vs 91,3% EUCAST,  $p < 0,0001$  IC95%) e do Grupo

D (2009-2011) ao antibiótico cefoxitina, para o qual também se verificou um aumento de isolados resistentes (48,1% CLSI Vs 85,2% EUCAST,  $p=0,0084$  IC95%). Com significado clínico ( $p \geq 0,05$  IC95%), importa mencionar o aumento da resistência à cefoxitina (4,3% CLSI Vs 13,0% EUCAST) nos isolados do Grupo C, e à gentamicina (63,0% CLSI Vs 81,5% EUCAST) nos isolados do Grupo D. Neste grupo de isolados verificou-se também uma redução da suscetibilidade à ciprofloxacina (56,6% CLSI Vs 33,3% EUCAST), com aumento na suscetibilidade intermédia (7,4% CLSI Vs 25,9% EUCAST), e no perfil do antibiótico imipenemo, redução de resistência (92,6% CLSI Vs 74,1% EUCAST), com aumento da suscetibilidade intermédia (0,0% CLSI Vs 18,5% EUCAST).



**Figura 10.** Comparação do perfil de suscetibilidade dos isolados hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* dos Grupos C (2002-2008) e D (2009-2011), de acordo com os critérios de suscetibilidade do CLSI e EUCAST (2014).

Legenda: AMC amoxicilina-ácido clavulânico; FOX cefoxitina; CAZ ceftazidima; CTX cefotaxima; GM gentamicina; CIP ciprofloxacina; IMP imipenemo; \*Resultado estatisticamente significativo,  $p < 0,05$  (CLSI Vs EUCAST); \*\*Resultado clinicamente significativo (CLSI Vs EUCAST)

Os resultados apresentados na Figura 10. evidenciam uma discrepância na classificação dos isolados de *K.pneumoniae* quando utilizados os critérios americanos (CLSI) ou europeus (EUCAST), sendo esta diferença mais acentuada para os antibióticos amoxicilina-ácido clavulânico e cefoxitina mas clinicamente relevante também para os antibióticos ciprofloxacina e imipenemo. Em todas as situações, com excepção do imipenemo, os critérios EUCAST foram mais restritivos que os CLSI, aumentando a resistência dos isolados por diminuição dos isolados susceptíveis ou com suscetibilidade intermédia. No entanto, na situação do imipenemo verifica-se que ocorre uma diminuição dos isolados resistentes e aumento da suscetibilidade intermédia, estando assim comprometida uma eficiente informação ao clínico, com possíveis consequências a nível terapêutico. Vading *et al.* reporta que os critérios definidos pelo EUCAST para o imipenemo falham na identificação de isolados produtores de carbapenemases, contrariamente aos critérios definidos para o meropenemo e ertapenemo, mesmo quando utilizados os meios automatizados.<sup>104</sup> De forma a reduzir a pressão selectiva sobre os isolados, é imperativo que se monitorizem também os perfis de suscetibilidade intermédia e não somente os perfis de resistência. Adicionalmente, em isolados com expressão fenotípica compatível com a presença de uma carbapenemase deverão ser utilizados testes fenotípicos como o teste de disco combinado com EDTA e ácido borónico.<sup>105</sup>

A nível internacional, foi celebrado um Memorando de Entendimento em 2012 entre as organizações CLSI e EUCAST para a criação de Grupos de Trabalho conjuntos, com o principal objectivo de promover uma aproximação das entidades.<sup>106</sup> A Norma 004/2013 de 21/02/2013 da Direção Geral da Saúde “Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos” menciona que os critérios utilizados para definição dos microrganismos “alerta”, nos quais se incluem as *Enterobacteriaceae* com suscetibilidade intermédia ou resistência aos carbapenemos e/ou presumíveis produtores de carbapenemases, deverão estar baseados nas recomendações do EUCAST, devendo esta implementação

ocorrer nos laboratórios de microbiologia portugueses até Janeiro de 2014.<sup>87</sup> No estudo de vigilância epidemiológica EARS-Net de 2012 as recomendações seguidas por Portugal são as CLSI,<sup>33,106</sup> assim como a informação disponibilizada pelo EUCAST em 2013, ano em que Portugal iniciou representação no Comité Geral da “*National Antimicrobial Susceptibility Testing Committees*” indica que não existe informação disponível sobre a implementação dos critérios EUCAST a nível nacional.<sup>106</sup>

Dada a crescente resistência ao imipenemo, importa também perceber a tendência de evolução dos critérios definidos pelo CLSI e EUCAST e a consequência destas variações na análise do perfil de suscetibilidade. Assim, foram comparados os critérios utilizados para os anos de 2010 e 2014 cujos resultados são apresentados na Tabela 6 e na Figura 11.

**Tabela 6.** Critérios de CLSI e EUCAST publicados em 2010 e 2014 para interpretação do teste de suscetibilidade ao antibiótico imipenemo.

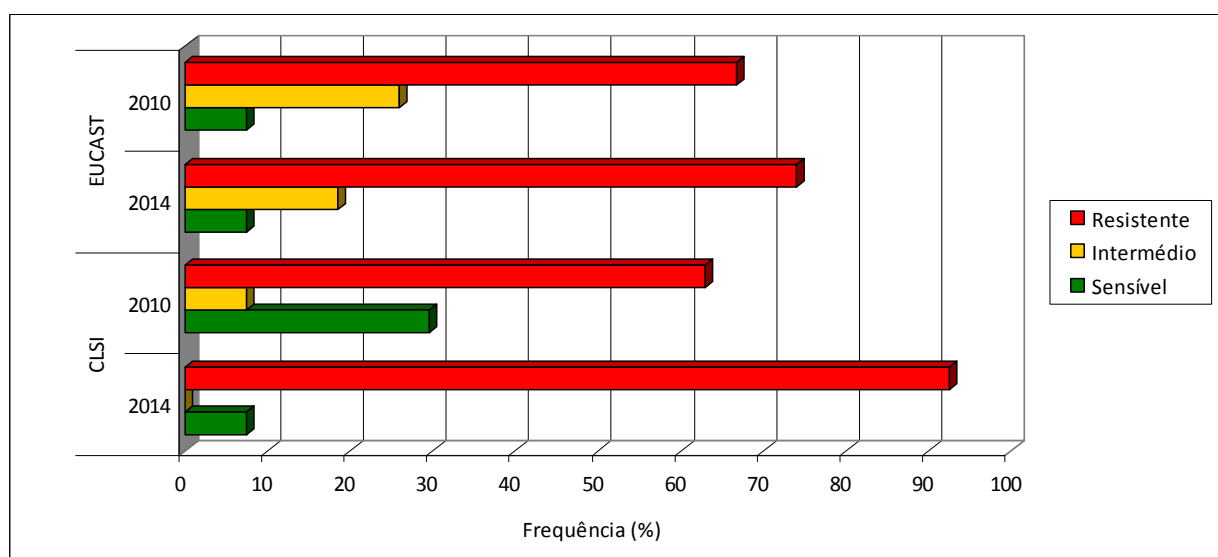
| Entidade | Ano  | Perfil de Susceptibilidade ao IMP |       |     |                       |          |           |
|----------|------|-----------------------------------|-------|-----|-----------------------|----------|-----------|
|          |      | Critérios                         |       |     | Nº isolados (%), n=27 |          |           |
|          |      | S                                 | I     | R   | S                     | I        | R         |
| CLSI     | 2010 | ≥16                               | 16-18 | ≤15 | 8 (29,6)              | 2 (7,4)  | 17 (63,0) |
|          | 2014 | ≥23                               | 20-22 | ≤19 | 2 (7,4)               | 0        | 25 (92,6) |
| EUCAST   | 2010 | ≥21                               | 15-20 | <15 | 2 (7,4)               | 7 (25,9) | 18 (66,7) |
|          | 2014 | ≥22                               | 16-21 | <16 | 2 (7,4)               | 5 (18,5) | 20 (74,1) |

Legenda: CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute; EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; S – sensível; I – Intermédio; R - Resistente

Quando comparado o perfil de suscetibilidade se utilizados os critérios do EUCAST para o imipenemo no ano de 2010 (S≥21; I 15-20; R<16) e 2014 (S≥22; I 16-20; R<15) verifica-se que não existem alterações estatisticamente significativas ( $p \geq 0,05$  IC95%). No entanto, em termos clínicos, importa mencionar que a



alteração de critérios ocorrida entre 2010 e 2014 (de 1 mm) se reflecte na diminuição de isolados com suscetibilidade intermédia (25,9% EUCAST 2010 Vs 18,5% EUCAST 2014) e aumento da resistência (66,7% EUCAST 2010 Vs 74,1% EUCAST 2014). Por sua vez, quando analisados os perfis de suscetibilidade ao imipenemo com os critérios do CLSI de 2010 ( $S \geq 16$ ; I 16-18;  $R < 15$ ) e 2014 ( $S \geq 23$ ; I 20-22;  $R < 19$ ) verificamos que os aumentos de 4 a 7 mm apresentaram como consequência a redução dos isolados sensíveis (29,6% CLSI 2010 Vs 7,4% CLSI 2014), a ausência de isolados de suscetibilidade intermédia (7,4% CLSI 2010) e o aumento estatisticamente significativo da frequência de isolados resistentes (63% CLSI 2010 Vs 93% CLSI 2014,  $p=0,0194$  IC95%).



**Figura 11.** Perfil de suscetibilidade ao imipenemo dos isolados do Grupo D, de acordo com os critérios do CLSI e EUCAST publicados em 2010 e 2014. Legenda: CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute; EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Não é consensual a utilização de critérios interpretativos que transformem a categoria sensível dos carbapenemos em resistentes quando se identifica uma potencial enzima carbapenemase, à semelhança

do que acontecia antes de 2010 com as cefalosporinas de espectro alargado nos isolados produtores de ESBL. Recomendações de especialistas do EUCAST para a interpretação dos resultados dos testes de suscetibilidade mencionam a necessidade de efectuar a supressão de resultados que poderão ser inapropriados clinicamente e a possibilidade de edição de resultados, passando de perfis de susceptíveis para intermédios/resistentes, assim como de intermédios para resistentes. Estas orientações baseiam-se na evidência clínica e/ou microbiológica.<sup>107</sup> No entanto, o CLSI e EUCAST, dadas as actualizações dos critérios efectuadas, recomendam de forma expressa que se devem reportar os resultados dos carbapenemos em função dos critérios de sensibilidade estabelecidos, sem modificar a interpretação obtida.<sup>107,108</sup> O perfil do doente, a gravidade da situação e a existência de co-morbilidade são factores importantes que têm que ser considerados, bem como o local da infecção e principalmente o padrão de suscetibilidade do agente etiológico. A informação regional e nacional deverá ser utilizada para avaliar a eficácia dos antibióticos para a flora bacteriana atual e infeções associadas, assim como para promover a atualização de recomendações clínicas para terapêuticas empíricas, essencial nos cuidados de saúde. A definição de critérios harmonizados a nível mundial, baseados no tratamento eficaz dos doentes e não na detecção de mecanismos de resistência poderão levar à modificação das orientações no futuro.

### III.3. Determinantes genéticos de resistência: produção de $\beta$ -lactamases

Após determinação do perfil fenotípico dos isolados, importa efectuar a caracterização dos mecanismos moleculares de resistência aos antibióticos. No presente trabalho foram pesquisados os genes que codificam para as  $\beta$ -lactamases: *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>OXA</sub>. Os genes identificados foram purificados e sequenciados de forma a identificar a  $\beta$ -lactamase produzida, cujos resultados são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Determinantes de resistência dos isolados de *K. pneumoniae*: fenótipo de resistência e  $\beta$ -lactamase produzida.

|                               | Nº Total de estirpes | Determinantes de resistência |     |     |     |     |   |                                 |
|-------------------------------|----------------------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|---|---------------------------------|
|                               |                      | Fenótipo de resistência      |     |     |     |     | $\beta$ -lactamase  | n                               |
|                               |                      | AMX                          | AMC | CAZ | CTX | IMP |   |                                 |
| <b>Grupo A</b><br>(1980-1989) | 15                   | S                            | S/I | S   | S   | S   | TEM-1, SHV-1  | 15                              |
| <b>Grupo B</b><br>(1990-2001) | 12                   | R                            | I/R | R   | I/R | S   | TEM-10<br>TEM-24  | 7<br>5                          |
| <b>Grupo C</b><br>(2002-2008) | 46                   | R                            | I/R | I/R | R   | S   | CTX-M-15  | 46                              |
| <b>Grupo D</b><br>(2009-2011) | 27                   | R                            | R   | R   | R   | I/R | KPC-3<br>KPC-3, TEM-1<br>KPC-3, SHV-1<br>KPC-3, TEM-1, SHV-1<br>KPC-3, TEM-1, SHV-11<br>KPC-3, TEM-1, SHV-35<br>KPC-3, TEM-1, SHV-1, CTX-M-15 | 3<br>3<br>1<br>9<br>4<br>1<br>6 |

Legenda: AMX- amoxicilina; AMC- amoxicilina-ácido clavulânico; CAZ-ceftazidima; CTX- cefotaxima; IMP – Imipenemo;

S- sensível; I-intermédio; R-resistente

Na Tabela 7 são apresentados os resultados referentes à identificação das  $\beta$ -lactamases pelos isolados em estudo, assim como os fenótipos de resistência característicos, os quais têm em conta o comportamento aos antibióticos amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, ceftazidima, cefotaxima e imipenemo.

Os isolados do Grupo A (1980-1989) caracterizam-se por um perfil de sensibilidade aos antibióticos AMX, CAZ, CTX e IMP e apresentam suscetibilidade ou suscetibilidade intermédia à combinação AMC. Foram identificados os genes codificantes para as enzimas TEM-1 e SHV-1 (n=15). O Grupo B é constituído pelos isolados produtores das enzimas TEM-10 (n=7) e TEM-24 (n=5), sendo caracterizados por um perfil de resistência à AMX e CAZ, podendo apresentar suscetibilidade intermédia ou resistência à amoxicilina-ácido clavulânico e cefotaxima. Por sua vez, os isolados do Grupo C (2002-2008) são isolados produtores da cefotaximase CTX-M-15 (n=46) e caracterizam-se por um perfil de resistência à amoxicilina e cefotaxima, tendo suscetibilidade intermédia ou resistência à amoxicilina-ácido clavulânico e ceftazidima. Os isolados dos Grupos A, B e C apresentam suscetibilidade ao imipenemo.

Finalmente, os isolados do Grupo D (2009-2011) apresentam um perfil fenotípico com resistência à amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, ceftazidima e cefotaxima. Este grupo apresenta suscetibilidade intermédia ou resistência ao imipenemo e os isolados são produtores da carbapenemase KPC-3, a qual foi identificada de forma isolada (n=3) ou em associação com outras  $\beta$ -lactamases (n=24). Estas associações foram verificadas com as enzimas de espectro restrito: TEM-1 (n=3), SHV-1 (n=1), TEM-1 + SHV-1 (n=9) e TEM-1 + SHV-11 (n=4). Verificou-se também a existência de isolados com enzimas de espectro alargado: SHV-35 (n=1) e CTX-M-15 (n=6).

Foram também pesquisadas a presença da  $\beta$ -lactamase AmpC plasmídica DHA, assim como metalo- $\beta$ -

lactamases (NDM, IMP e VIM) e carbapenemases do tipo OXA, principalmente considerando a disseminação mundial de OXA-48.<sup>29,109-111</sup> Não se verificou a presença de nenhuma das enzimas pesquisadas na amostra em estudo.

As  $\beta$ -lactamases representam uma das principais causas de resistência a antibióticos em infecções associadas o isolados Gram-negativo.<sup>112</sup> Sendo a *K. pneumoniae* um dos microrganismos mais frequentemente associados a infecções severas, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade,<sup>113</sup> a identificação dos determinantes genéticos de resistência nestos isolados e a análise da sua evolução ao longo dos últimos 31 anos reveste-se da maior importância clínica.

Os isolados representativos da década de 1980 apresentam a produção de penicilinas da Classe A, nomeadamente as  $\beta$ -lactamases TEM-1 e SHV-1, enzimas de espectro restrito que conferem resistência às penicilinas e seus derivados (como a amoxicilina e ampicilina)<sup>114</sup> e cefalosporinas de primeira geração (cefalotina e cefaloridina).<sup>21</sup> A produção das enzimas TEM-1 foi descrita pela primeira vez em 1965 em *E. coli*<sup>115</sup> enquanto a SHV-1 foi reportada pela primeira vez em isolados do género *Klebsiella*.<sup>116</sup> Ambos os genes *bla*<sub>TEM-1</sub> e *bla*<sub>SHV-1</sub> codificam para enzimas de localização cromossómica,<sup>10,22</sup> sendo frequentemente identificados em isolados clínicos de *K. pneumoniae*.<sup>117</sup>

Actualmente são conhecidas cerca de duas centenas de variantes das TEM<sup>118</sup>, que derivam das parentais TEM-1 e TEM-2 por alteração de um número limitado de aminoácidos,<sup>112</sup> incluindo as ESBL TEM-10 e TEM-24 identificadas nos isolados representativas dos anos de 1990 a 2001. A TEM-10 foi predominante nos Estados Unidos da América na década de 1990.<sup>119-121</sup> Em Portugal, o gene *bla*<sub>TEM-10</sub> foi descrito pela primeira vez em 1999, num isolado clínico de *Morganella morganii*,<sup>2</sup> sendo que em 2000 foi reportada a endemicidade desta enzima em *K. pneumoniae*.<sup>122</sup> Por sua vez, a TEM-24 foi identificada pela primeira

vez no ano de 1988 em França num isolado de *K. pneumoniae*, tendo posteriormente sido reportadas ocorrências em várias espécies isoladas em todo o mundo.<sup>123,124</sup> Inicialmente foi associada a elevada prevalência de isolados produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado do tipo TEM à extensa utilização de cefalosporinas de espectro alargado. No entanto, verificou-se ser uma relação directa entre o surgimento de resistências como resultado directo da terapêutica com cefalosporinas.<sup>22</sup> Adicionalmente, importa mencionar que mesmo após descontinuação da utilização de ceftazidima e outras cefalosporinas, se verifica a continuidade de colonização de doentes com isolados produtores de ESBL.<sup>125</sup>

Uma década após a sua primeira identificação em 1990,<sup>126</sup> as enzimas do tipo CTX-M-15 tornaram-se a ESBL predominante em isolados de *Enterobacteriaceae* em todo o mundo,<sup>112</sup> situação que permanece até à actualidade.<sup>127-130</sup> Estas enzimas conferem resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, com excepção da cefoxitina e carbapenemos,<sup>21,131</sup> tendo sido identificada pela primeira vez em Portugal numa estirpe de *K. pneumoniae* isolada em 2002.<sup>67</sup> No presente trabalho o gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> foi identificado nas estirpes representativas de 2002 a 2008.

As carbapenemases do tipo KPC têm emergido principalmente em *K. pneumoniae*<sup>132</sup> desde o ano de 2000, apresentando elevada prevalência nos USA, América Latina, Israel e Europa<sup>133-141</sup>, com especial incidência na Grécia<sup>142</sup> e Itália<sup>43</sup>. A carbapenemase KPC hidrolisa o imipenemo, meropenem, ertapenem, aztreonamo, ceftazidima, cefotaxima, cefepima e a cefoxitina<sup>143</sup>. A primeira identificação de KPC-3 em Portugal ocorreu em 2009, numo isolado de *K. pneumoniae*.<sup>144</sup> Além dos genes *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>KPC-3</sub>, mais frequentemente identificados,<sup>145-150</sup> têm sido já reportados novos genes como o *bla*<sub>KPC-15</sub><sup>151,152</sup>, *bla*<sub>KPC-16</sub> e *bla*<sub>KPC-17</sub>.<sup>153</sup>

No âmbito do presente estudo foi reportada a emergência de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-3 e, pela primeira vez em Portugal, a associação da carbapenemase KPC-3 com outros tipos de  $\beta$ -lactamases no mesmo isolado, nomeadamente cefalosporinases de espectro restrito como a SHV-11 e de espectro alargado como a SHV-35 e CTX-M-15.<sup>154</sup> A enzima SHV-35 foi identificada pela primeira vez numo isolado de *K. pneumoniae* em 2001, conferindo resistência à cefepima.<sup>14</sup> Na presença de carbapenemases, outras  $\beta$ -lactamases podem não ser identificadas por causa do espectro de actividade, promovendo a disseminação facilitada destes isolados.<sup>155</sup> Estas associações actuam de forma sinérgica, aumentando o espectro de resistência dos isolados assim como a sua complexidade genética, dadas as possíveis mutações na disseminação horizontal e vertical entre isolados. Esta disseminação deverá ser monitorizada de forma rigorosa, dado que a emergência de isolados resistentes ao imipenemo têm um sério impacto nas opções terapêuticas disponíveis. Para além disso, num mundo global no qual países ou regiões podem funcionar como reservatório destes organismos,<sup>156</sup> a vigilância epidemiológica é crucial para recolher dados que sejam utilizados na prevenção e controlo das taxas de infecção por *K. pneumoniae*.

### III.4. Ambiente genético

A aquisição de elementos genéticos móveis, assim como a perda de regiões de DNA cromossômico nas diferentes linhagens celulares, permitem uma dinâmica de evolução dos isolados hospitalares e da comunidade.<sup>7</sup> A eficiência com a qual a resistência aos antimicrobianos se dissemina entre as bactérias da mesma espécie e/ou entre espécies e gêneros distintos está relacionada com dois mecanismos de transmissão dos genes de resistência: vertical e horizontal. No primeiro caso, a transmissão acontece da célula-mãe para as células filhas como resultado da divisão celular. A transferência horizontal, por sua vez, requer outros elementos genéticos, tais como plasmídeos, transposões e/ou integrões.<sup>157</sup>

Embora a ocorrência de mutações possa conferir resistência a antibióticos, são os genes adquiridos por meio de transferência horizontal que constituem a principal ameaça na aquisição e disseminação da resistência aos antibióticos.

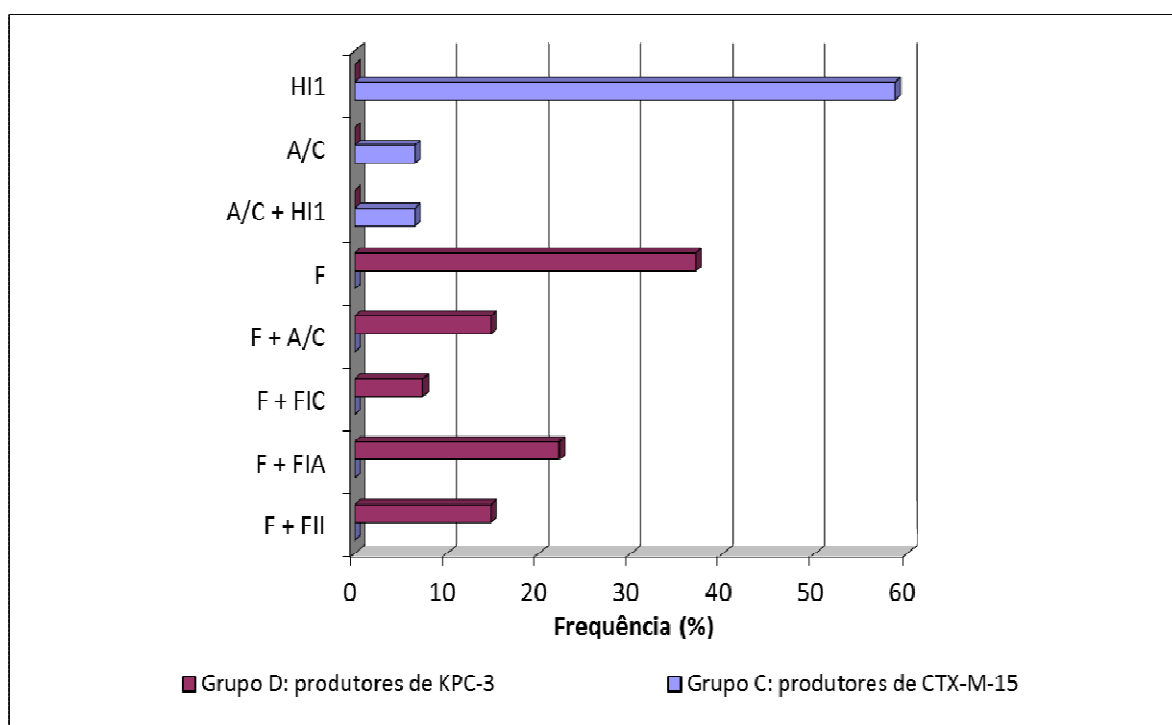
#### III.4.1. Grupos de incompatibilidade plasmídica

Alguns plasmídeos são incompatíveis, fenômeno denominado de incompatibilidade plasmídica, sendo que a interação entre dois destes plasmídeos tem como consequência a destruição de um deles. Dessa forma, os plasmídeos podem ser colocados em “grupos de incompatibilidade” (ou grupos Inc), que dependem da sua capacidade de coexistirem numa única célula.<sup>48</sup> Foram pesquisadas 18 origens de replicação representativas dos grupos de incompatibilidade mais frequentemente associados à resistência antimicrobiana em enterobactérias, conforme descrito por Carattoli *et al.* (2005).<sup>48</sup> Os resultados são apresentados na Figura 12.

Os isolados produtores de CTX-M-15 apresentam mais frequentemente o grupo de incompatibilidade



IncHI1 (58,7%, 27/46), seguido do IncA/C e da combinação IncA/C (6,52%, 3/46) e HI1 (6,52%, 3/46). Por sua vez, os isolados produtores de KPC-3 apresentam de forma mais frequente o grupo Inc F (37,03%, 10/27), assim como a combinação deste com outros grupos de incompatibilidade, nomeadamente: IncF e FII (14,8%, 4/27); IncF e FIA (22,2%, 6/27); IncF e FIC (7,4%, 2/27) e IncF e A/C (14,8%, 4/27). Não se verificou amplificação dos genes associados aos grupos de incompatibilidade plasmídica em 13 isolados.



**Figura 12.** Grupos de incompatibilidade plasmídica identificados em isolados de *K. pneumoniae* produtores de CTX-M-15 e KPC-3.

O estudo dos plasmídeos representa um dos desafios mais complexos para contrariar a disseminação da resistência antimicrobiana<sup>158</sup> uma vez que os plasmídeos promovem a transferência horizontal de genes entre bactérias sem vínculos epidemiológicos aparentes.<sup>159</sup> Desta forma, a identificação de plasmídeos é um primeiro passo para a concepção de estratégias de intervenção para o controlo de infecção de isolados multiresistentes produtores de ESBL, de forma a impedir ou reduzir a sua propagação.<sup>160</sup>

Estes plasmídeos pertencem a famílias que são em grande parte prevalentes em bactérias naturais, geralmente carregam múltiplos determinantes genéticos ligados fisicamente, que conferem resistência a diferentes classes de antibióticos em simultâneo e que se disseminam a partir de um ancestral comum.<sup>161</sup> Os plasmídeos também abrigam fatores de virulência e sistemas de dependência, promovendo a sua estabilidade e manutenção no hospedeiro bacteriano, em diferentes condições ambientais.<sup>162</sup> Pode, no entanto, ocorrer instabilidade plasmídica principalmente pela manipulação *in vitro* e pela transferência para outros hospedeiros. Lopez-Camacho *et al.* descrevem que os plasmídeos contendo genes de resistência apresentam maior instabilidade.<sup>163</sup> Por sua vez, Carattoli *et al.* descrevem que os genes de resistência podem estar no cromossoma bacteriano ou num plasmídeo de um grupo de incompatibilidade não tipificáveis pela técnica utilizada,<sup>49</sup> sendo que, pelo historial de investigação prévia de alguns dos isolados, se considera que esta última hipótese é a justificação para que não tenha sido possível determinar o Grupo de Incompatibilidade para todos os isolados em estudo.

No presente estudo destaca-se também uma especificidade dos grupos de Incompatibilidade plasmídica de acordo com a  $\beta$ -lactamase identificada, reforçando-se a dominância dos plasmídeos IncA/C e HI1 em isolados produtores de CTX-M-15 e dos plasmídeos dos grupos de incompatibilidade IncA/C, Inc FIA, IncFII e IncF nos isolados produtores de KPC-3, os quais se encontram associados a um elevado potencial de disseminação e persistência.<sup>164 165</sup> Estudos complementares foram efectuados no decorrer do presente trabalho, com 3 isolados de *K. pneumoniae* produtores da carbapenemase KPC-3: 1 isolado com o Grupo de Incompatibilidade IncF e 2 isolados que apresentavam em simultâneo os Grupos IncF e IncFIA. Por conjugação, os três isolados transferiram o plasmídeo IncF para a *E. coli* K12 J53. Por PCR confirmou-se a presença do gene *bla*<sub>KPC-3</sub> no isolado de *E. coli*, verificando-se a aquisição de resistência à amoxicilina-ácido clavulânico, cefotaxima e ceftazidima. A aquisição do gene *bla*<sub>KPC-3</sub> também diminuiu a suscetibilidade da *E. coli* à cefoxitina e imipenemo, com diminuição do diâmetro da zona de inibição em

13 e 9 mm, respectivamente.<sup>166</sup> Com este ensaio foi possível determinar que a transferência do gene KPC-3 está associada ao plasmídeo do grupo IncF.

### III.4.2. Transposões

Os cromossomas bacterianos contêm fragmentos de DNA capazes de se mover de uma localização para outra no genoma, sendo o processo denominado transposição.<sup>167</sup> A transposição é um fenómeno natural que ocorre *in vivo*, sendo que a movimentação de segmentos de DNA no genoma se deve à presença de elementos genéticos especiais designados transposões, elementos genéticos móveis constituídos por duas sequências de inserção (IS) que ladeiam um ou mais genes que este transporta. Alguns desses genes conferem por exemplo resistência a antibióticos, produção de toxinas, enzimas degradativas entre outros.<sup>168</sup> No presente estudo, foram pesquisadas as sequências de inserção *IS15* e *IS26* para os isolados do Grupo A e B, as sequências de inserção *IS903* e *ISEcp1* para os isolados do Grupo C e o transposão *Tn4401* para os isolados do Grupo D.

Não foram identificadas as sequências de inserção *IS15* e *IS26* nos isolados produtores de TEM de espectro restrito e alargado em estudo. Nos isolados do Grupo C, produtores de CTX-M-15, foi identificada a sequência de inserção *ISEcp1* (100,0%, 46/46) enquanto nos isolados do Grupo D, produtores de KPC-3, foi identificado o transposão *Tn4401* em todos os isolados (100,0%, 27/27). Foram, assim, identificados distintos ambientes genéticos de acordo com os grupos de resistência dos isolados.

A utilização de plataformas de sequenciação em larga escala permitiu ampliar os conhecimentos relativos aos elementos genéticos móveis associados à evolução da resistência bacteriana.<sup>92</sup> Naas *et al.*

descreveram que o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> estava inserido no transposição *Tn4401*,<sup>73</sup> tendo posteriormente sido descritas variações a este transposição: Curiao *et al.* descrevem uma variante com uma deleção de 100pb a jusante do gene *bla*<sub>KPC-3</sub><sup>168</sup> enquanto um outro estudo de Shen *et al.* descrevem a substituição do gene *ISKpn7* a montante do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> pelo gene *ISKpn8*.<sup>169</sup> No presente estudo, foi identificada a estrutura do transposição *Tn4401* nos isolados produtores da carbapenemase KPC-3 descrito por Cuzon G *et al.*<sup>142</sup> O *Tn4401*, localizado em diferentes *loci* e inserido em plasmídeos com diferentes tamanhos e grupos de incompatibilidade, é capaz de transposição replicativa,<sup>43</sup> a qual ocorre com elevada frequência para este transposição.<sup>170</sup>

### III.4.3. Pesquisa de integrações

Foram pesquisados os integrações da Classe 1, cujos resultados se encontram apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Integrões de Classe 1 e identificação de cassetes genéticas

|                   | Integrões da Classe 1 |                  |                             |   |
|-------------------|-----------------------|------------------|-----------------------------|---|
|                   | nTotal                | n (%)            | Tamanho dos fragmentos (pb) | Cassetes genéticas                        |
| Grupo A: TEM RSBL | 15                    | 13 (86,7)        | 1000 pb; 3000 pb            | <i>aadA1</i> <i>qacEdelta1-aadA1-orfQ</i> |
| Grupo B: TEM ESBL | 12                    | 12 (100,0)       | 1000 pb; 1800 pb            | <i>dfrA5</i> <i>dfrA15-aadA1</i>          |
| Grupo C: CTX-M-15 | 46                    | 31 (67,4)        | 1000 pb; 1500 pb            | <i>aacA4</i> <i>aadA1-dhfrA1</i>          |
| Grupo D: KPC-3    | 27                    | 15 (55,6)        | 1000 pb                     | <i>dfrA30</i>                             |
| <b>TOTAL</b>      | <b>100</b>            | <b>71 (71,0)</b> |                             |   |

Legenda: RSBL:  $\beta$ -lactamase de espectro restrito; ESBL:  $\beta$ -lactamase espectro alargado; pb: pares de bases

Foram identificados integrões da Classe 1 em 71 isolados (71,0%, 71/100) em fragmentos maioritariamente de 1000 pares de bases (pb), mas também de 3000pb em isolados do Grupo A, 1800pb em isolados do Grupo B e 1500pb em isolados do Grupo C. Quando estes resultados são analisados de acordo com o tipo de  $\beta$ -lactamase produzida, verificamos que os isolados produtores de  $\beta$ -lactamases TEM de espectro restrito (Grupo A) e os isolados produtores das  $\beta$ -lactamases TEM de espectro alargado (Grupo B) apresentam mais frequentemente integrões da classe 1 (86,7 e 100,0% dos isolados, respectivamente), comparativamente aos isolados produtores da cetofoximase CTX-M-15 (Grupo C) e carbapenemase KPC-3 (Grupo D), nos quais 67,4% e 55,6% dos isolados, apresentam integrões da classe 1, respectivamente. Sete tipos de cassetes genéticas foram identificadas, nomeadamente: *aadA1*, *qacEdelta-aadA1-orfQ*, *dfrA15*, *dfrA15-aadA1*, *aacA4*, *aadA1*, *dhdA1* e *dfrA30*.

Os isolados do Grupo A, produtores de TEM de espectro restrito, apresentaram cassetes genéticas constituídas pelo gene *aadA1*, o qual codifica para a enzima aminoglicosídeo adeniltransferase que

confere resistência aos aminoglicosídeos, nomeadamente à estreptomicina e espectomicina. Associado a este gene foram também identificadas sequências de DNA compreendidas entre um codão de início da tradução e um codão de terminação, denominados de “*open reading frame (orf)*.” Foi também identificado o gene *qacEdelta1*, o qual confere resistência a desinfetantes e anti-sépticos compostos à base de amónia quaternária, agente químico utilizado para desinfecção de equipamentos e materiais médico-cirúrgicos. Por este motivo, é aconselhável a utilização de combinações de produtos anti-sépticos, bem como a promoção de estudos de efectividade aos produtos utilizados, de forma a evitar a seleção de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar.<sup>171</sup>

No presente estudo, os genes *dfr*, nomeadamente o gene *dfrA5* e *dfrA15*, foram identificados nas cassetes genéticas dos isolados do Grupo B, produtores de TEM de espectro alargado. O gene *dfrA15* foi identificado em associação com o gene *aadA1*, alargando assim o espectro de resistência do gene *dfr* quando identificado isoladamente, o qual confere resistência ao trimetoprim. Por sua vez, os isolados do Grupo C, produtores de CTX-M, apresentam o gene que codifica a enzima 6'-N-aminoglicosideo-acetiltransferase (*aacA4*), o qual confere resistência aos aminoglicosídeos, nomeadamente à gentamicina e ampicacina, assim como a associação do gene *aadA1* e *dhfrA1*, este último que codifica para a enzima inibidora da diidrofolato redutase, o qual confere resistência ao trimetoprim. A cassette genética *aacA4* foi já descrita na Argentina, associada o isolados produtores de OXA-2.<sup>172</sup>

À semelhança de outros estudos,<sup>173 174</sup> a cassette genética mais frequente em *K. pneumoniae* foi a *aadA1*, associada à resistência aos aminoglicosídeos, existindo em todos os Grupos de isolados excepto no Grupo D, produtor da carbapenemase KPC. Nos isolados do Grupo D, produtores de KPC, é identificado, pela primeira vez em Portugal, um integrão da classe 1 contendo a cassette genética com o gene *dfrA30*. Este gene confere resistência ao trimetoprim e foi descrito pela primeira vez em 2011, num isolado de *K.*

---

*pneumoniae* isolado na Índia, proveniente da água de um rio,<sup>175</sup> alertando para a importância das bactérias oligotróficas como boas fontes de novos genes assim como potenciais reservatórios para cassetes genéticas de resistência.<sup>176</sup>

### III.5. Determinantes genéticos de virulência

A severidade das infecções bacterianas resulta de uma complexa interacção entre a suscetibilidade do hospedeiro e as características do agente patogénico, entre as quais se encontram os factores bacterianos de virulência.<sup>55</sup> Na amostra em estudo foram pesquisados por PCR, e confirmados por sequenciação, a distribuição de factores de virulência associados a infecções por *Klebsiella* spp.. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Prevalência dos factores de virulência em isolados de *K. pneumoniae* produtores de  $\beta$ -lactamases identificados em infecções hospitalares.

| Factores de Virulência (FV) |                          | Gene alvo                  | Frequência (%)<br>n=100 |
|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|
| <b>Aderência</b>            | Fímbrias do Tipo1        | <i>fimH</i>                | 96 (96,0%)              |
|                             | Fímbrias do Tipo 3, V1   | <i>mrkD<sub>V1</sub></i>   | 90 (90,0%)              |
|                             | Fímbrias do Tipo 3, V2-4 | <i>mrkD<sub>V2-4</sub></i> | 6 (6,0%)                |
| <b>Toxinas</b>              | Hemolisina               | <i>khe</i>                 | 63 (63,0%)              |
| <b>Tipo Capsular</b>        | K2                       | <i>K2A</i>                 | 23 (23,0%)              |
| <b>Sideróforo</b>           | Aerobactina              | <i>iucC</i>                | 6 (6,0%)                |

Pela análise da Tabela 9 verifica-se que os factores de virulência mais frequentemente identificados na amostra em estudo foram as adesinas fimbriais do tipo 1, codificadas pelo gene *fimH*, presentes em 96,0% (96/100) dos isolados e as adesinas fimbriais do tipo 3, variante 1, codificada pelo gene *mrkD<sub>V1</sub>*, as quais foram identificadas em 90,0% (90/100) dos isolados. O gene codificante para a toxina hemolisina foi identificado em 63,0% (63/100) dos isolados. Por sua vez, 6,0% (6/100) dos isolados hospitalares apresentam os genes codificantes para as fímbrias do tipo 3, variante 2-4 (*mrkD<sub>V2-4</sub>*) e para a aerobactina



(*iucC*). O tipo capsular K2 foi identificado em 23,0% (23/100) dos isolados em estudo.

Não obstante a frequência de identificação dos genes de virulência de forma individual, importa perceber também a forma como se agrupam nos isolados, verificando-se a existência de padrões predominantes. Assim, foram verificados os padrões de virulência da amostra em estudo pode ser observado na Tabela 10.

**Tabela 10.** Padrões de virulência identificados em isolados hospitalares de *K. pneumoniae*.

| Padrão de virulência | Frequência<br>Total de<br>estirpes<br>n=100 | Genes de virulência                  | Frequência de<br>estirpes<br>n=100 |
|----------------------|---|--------------------------------------|------------------------------------|
| <b>2 genes</b>       | 33  | <i>fimH, mrkDV1</i>                  | 27                                 |
|                      |   | <i>khe, mrkDV1</i>                   | 3                                  |
|                      |   | <i>fimH, khe</i>                     | 3                                  |
| <b>3 genes</b>       | 52  | <i>fimH, khe, mrkDV1</i>             | 35                                 |
|                      |   | <i>K2, fimH, mrkDV1</i>              | 9                                  |
|                      |   | <i>fimH, khe, mrkDV2-4</i>           | 5                                  |
|                      |   | <i>khe, mrkDV1, iucC</i>             | 1                                  |
|                      |   | <i>fimH, mrkDV1, iucC</i>            | 1                                  |
|                      |   | <i>K2, fimH, khe</i>                 | 1                                  |
| <b>4 genes</b>       | 13  | <i>K2, fimH, khe, mrkDV1</i>         | 11                                 |
|                      |   | <i>fimH, khe, mrkDV1, iucC</i>       | 2                                  |
|                      |   | <i>K2, fimH, khe, mrkDV1, iucC</i>   | 1                                  |
| <b>5 genes</b>       |   | <i>K2, fimH, khe, mrkDV2-4, iucC</i> | 1                                  |

Pela análise da Tabela 10, verifica-se que os isolados hospitalares de *K. pneumoniae* apresentam 13 padrões de virulência distintos. Estes padrões apresentam predominantemente 3 (52%, 52/100) ou 2 genes de virulência (33%, 33/100) na mesmo isolado. De forma menos frequente são identificados

padrões com 4 (13%, 13/100) ou 5 genes (2%, 2/100). A associação de genes de virulência - *fimH*, *khe*, *mrkDV<sub>1</sub>* - constitui o padrão mais comum (35%, 35/100), seguido do padrão com a ausência do gene codificante para a hemolisina (*fimH*, *mrkDV<sub>1</sub>*), identificado em 27% dos isolados (27/100). Foram identificados os genes de virulência que codificam para as fímbrias do tipo 1 e do tipo 3 na mesmo isolado em 92% (92/100) da amostra em estudo, nomeadamente 86% (86/100) com os genes *fimH*, *mrkDV<sub>1</sub>* e 6% (6/100) com os genes *fimH*, *mrkDV<sub>2-4</sub>*. O padrão *K<sub>2</sub>*, *fimH*, *khe*, *mrkDV<sub>1</sub>* e *K<sub>2</sub>*, *fimH*, *mrkDV<sub>1</sub>* foi identificado em 11% (11/100) e 9% (9/100), respectivamente. Os restantes 9 padrões de virulência foram identificados em cada amostra em frequência igual ou menor que 5%.

A aderência das bactérias às superfícies mucosas é um passo essencial para o desenvolvimento da infecção,<sup>85</sup> sendo que nas bactérias Gram-negativo a aderência é mediada por adesinas, das quais se destacam as adesinas fimbriais do tipo 1 e/ou tipo 3.<sup>1</sup> As adesinas do tipo 1, codificadas pelo gene *fimH*, medeiam a aderência aos receptores das células do hospedeiro que contêm manose.<sup>1</sup> Por sua vez, as adesinas do tipo 3, codificadas pelo gene *mrkD*, aderem na ausência de manose e promovem a formação de biofilmes.<sup>53</sup> Alcantar-Curiel *et al.* reportaram em 2013 a natureza multi-fimbrial da interacção com as células do hospedeiro e superfícies inertes, demonstrando uma eficiente aderência tanto em vidro como em polipropileno, assim como formação de biofilme em poliestireno.<sup>177</sup> Os resultados obtidos no presente trabalho, no qual em 92% dos isolados coexistem os genes *fimH* e *mrkD* reforçam a capacidade dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* produzirem simultaneamente fímbrias do tipo 1 do tipo 3 e a complementaridade desta associação na patogenicidade dos isolados.

As fímbrias do tipo 3 desempenham um papel importante na aderência bacteriana, apresentando capacidade de aderir a uma grande variedade de substratos.<sup>178</sup> Além disso, os resultados do presente estudo indicam que as fímbrias tipo 3 foram identificadas em 90% dos isolados de *K. pneumoniae*,

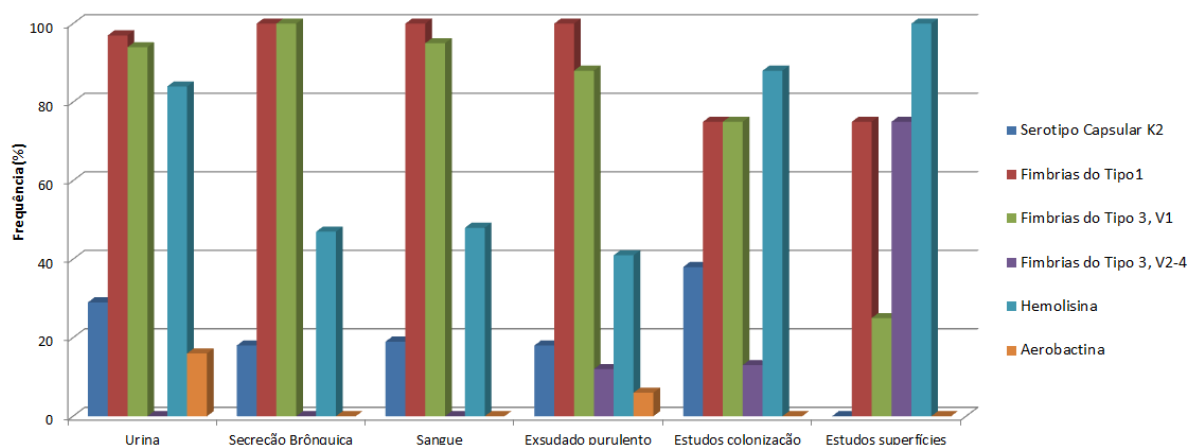
independente da origem biológica dos mesmos, sugerindo uma grande versatilidade das fímbrias tipo 3. Nos isolados hospitalares de *K. pneumoniae*, os resultados da presente tese demonstram que o alelo *mrkD<sub>V1</sub>* é o mais frequentemente identificado comparativamente aos alelos *mrkD<sub>V2-4</sub>* (90% Vs 6%,  $p < 0,05$ ). Encontram-se descritos quatro alelos (*mrkD<sub>V1</sub>*, *mrkD<sub>V2</sub>*, *mrkD<sub>V3</sub>* e *mrkD<sub>V4</sub>*) do gene *mrkD*, os quais conferem diferentes capacidades de aderência bacteriana, sendo o alelo *mrkD<sub>V1</sub>* o que codifica para a adesina com menor aderência e o *mrkD<sub>V3</sub>* o que apresenta maior capacidade de aderência,<sup>57</sup> factor que apresenta uma importância clínica em especial em situações de infeções urinárias em doentes algaliados.<sup>178</sup>

A produção capsular é um factor relevante para a patogenicidade bacteriana, dado que a cápsula confere resistência à fagocitose, opsonização e efeitos bactericidas do soro,<sup>1</sup> assim como desempenha um importante papel na protecção da *K. pneumoniae* na morte intracelular em acções de surfactantes e em situações de stress oxidativo.<sup>59</sup> Existem, pelo menos, 78 serótipos capsulares,<sup>179</sup> entre os quais o serótipo K2 tem sido identificado em isolados virulentos e associados a quadros severos de infecção hospitalar, como abscessos hepáticos,<sup>180</sup> bacteriémias,<sup>55</sup> pneumonias,<sup>181</sup> bem como em infeções adquiridas na comunidade.<sup>182</sup> No presente estudo, 23% dos isolados pertencem ao tipo capsular K2, sendo que 11% apresentam o padrão de virulência K2, *fimH*, *khe*, *mrkD<sub>V1</sub>* e 9% o padrão K2, *fimH*, *mrkDV<sub>1</sub>*.

Os padrões de virulência mais frequentemente identificados no presente trabalho são constituídos pelos genes de virulência *fimH*, *mrkDV<sub>1</sub>* com a presença (35%) ou ausência (27%) do gene *khe*, que codifica para a toxina hemolisina, com actividade hemolítica para os glóbulos vermelhos humanos. Os resultados demonstram que a presença de hemolisina e do serótipo K2 por si só não são factores de virulência críticos, embora tenham um papel relevante como potenciadores de virulência nos isolados hospitalares de *K. pneumoniae* produtores de  $\beta$ -lactamases.

Um aumento na eficiência da aquisição de ferro pela bactéria é muitas vezes apontado como um importante factor de patogenicidade. No presente trabalho, 6% dos isolados apresentam o gene *iucC*, sendo relevante mencionar que este gene se encontra presente nos padrões de virulência mais complexos, com três, quatro ou cinco genes de virulência. De facto, o crescimento da bactéria nos tecidos do hospedeiro é limitado pelos mecanismos de defesa e a disponibilidade de ferro. Sendo a concentração de ferro livre reduzida, as bactérias secretam sideróforos com elevada afinidade para o ferro, de modo a assegurarem o seu fornecimento.<sup>55</sup> Assim, a presença do gene *iucC* nos isolados, de forma cumulativa a outros factores de virulência e a multirresistência deve ser considerado um indicador de patogenicidade a considerar.

Pretendeu-se também verificar se existe variabilidade na frequência de factores de virulência de acordo com os principais produtos nos quais os isolados foram isolados. Os resultados são apresentados na Figura 13.



**Figura 13.** Factores de virulência identificados em isolados de *K. pneumoniae* de acordo com produtos biológicos e locais de identificação.

Como pode ser verificado pela Figura 13, as fímbrias do tipo 1 foram identificadas em 96,8% (30/31) dos isolados em urinas, assim como em todos os isolados (100,0%) provenientes dos produtos biológicos: secreções brônquicas (17/17), sangue (21/21) e exsudado purulento (17/17). Estas adesinas encontram-se também presentes em 75,0% dos isolados provenientes de estudos de colonização (6/8) e estudos de superfícies (3/4). No que infere às fímbrias do tipo 3 - variante 1, foi identificada em maior percentagem nos isolados identificadas em produtos clínicos, nomeadamente em secreções brônquicas (100,0%, 17/17), sangue (95,2%, 20/21), urina (93,5%, 29/31) e exsudado purulento (88,2%, 15/17) comparativamente aos isolados dos estudos de colonização (75,0%, 6/8) e ambientais (25,0%, 1/4). Por sua vez, a variante 2-4 desta adesina foi identificada em isolados identificadas em superfícies (75,0%, 3/4), provenientes dos estudos de colonização (12,5%, 1/8) e em isolados identificadas em exsudado purulento (11,7%, 2/17).

Verificou-se a existência de isolados *K. pneumoniae* do serótipo K2 em todos os produtos biológicos, nomeadamente em urina (29%, 9/31), sangue (19%, 4/21), secreções brônquicas (18%, 3/17) e exsudado purulento (18%, 3/17), mas também em 38% dos isolados provenientes de estudos de colonização (3/8). Não foi identificado o serótipo K2 nos isolados de estudos ambientais (n=4). A aerobactina foi identificada em isolados isoladas de urinas (16%, 5/31) e exsudado purulento (6%, 1/17). O gene que codifica para a hemolisina existe nas estirpes isoladas nas urinas (84%, 26/31), sangue (48%, 10/21), secreções brônquicas (47%, 8/17) e exsudados purulentos (7/17), assim como em todas os isolados provenientes dos estudos de superfícies (100%, 4/4) e em 88% das estirpes provenientes de estudos de colonização (7/8).

As infeções por *Klebsiella* spp. encontram-se frequentemente associadas a infeções urinárias, pneumonias e infeções da corrente sanguínea (septicémias). Considerando que os locais do corpo

humano afectados diferem consideravelmente no que diz respeito aos mecanismos de defesa do hospedeiro,<sup>1</sup> seria expectável encontrar uma especificidade nos factores de virulência identificados, principalmente, em isolados provenientes de urinas, secreções brônquicas e sangue.

As fímbrias do tipo 1 e do tipo 3 estão maioritariamente descritas como importantes factores de colonização no trato urinário.<sup>183-185</sup> Lin *et al.* efectuaram um estudo prospectivo para determinar as características do agente bacteriano *K. pneumoniae* decorrentes de infecção do trato urinário recorrente (ITUR) adquirida na comunidade em doentes diabéticos. Os isolados de *K. pneumoniae* associadas a ITUR apresentaram maior frequência de genes associados à aderência e capacidade invasiva do que os isolados de colonização ( $p < 0,01$ ). Os autores sugerem que o perfil de virulência identificado possibilita, mesmo quando ocorre tratamento antibiótico adequado, a persistência da *K. pneumoniae* no trato urinário.<sup>8</sup> Os resultados do presente estudo indicam que os isolados multiresistentes de *K. pneumoniae* isoladas em ambiente hospitalar e provenientes de produtos biológicos apresentam superior frequência de genes que codificam para as fímbrias do tipo 1 ( $p = 0,0054$ ) e tipo 3 - variante 1 ( $p = 0,0021$ ) do que os isolados provenientes de estudos ambientais e de colonização, embora não exista diferença ( $p > 0,05$ ) quando comparados os isolados isoladas dos distintos produtos biológicos. Desta forma, pode-se concluir que existe uma supremacia dos factores de virulência face ao produto produto biológico no qual são identificadas, pelo qual a capacidade de aderência e persistência não se encontra limitada ao trato urinário, potenciado a existência de reservatórios para infeções recorrentes e sérias complicações.

Também para os restantes factores de virulência não foi identificada especificidade de acordo com o produto biológico no qual o isolado é isolada, com excepção da aerobactina e hemolisina em isolados isoladas em urina. De facto, a aerobactina encontra-se mais frequentemente em isolados provenientes da urina comparativamente às restantes amostras biológicas ( $p = 0,0203$  IC 95%), embora a identificação deste gene em isolados isoladas em exsudado purulento indique que este factor de virulência contribui

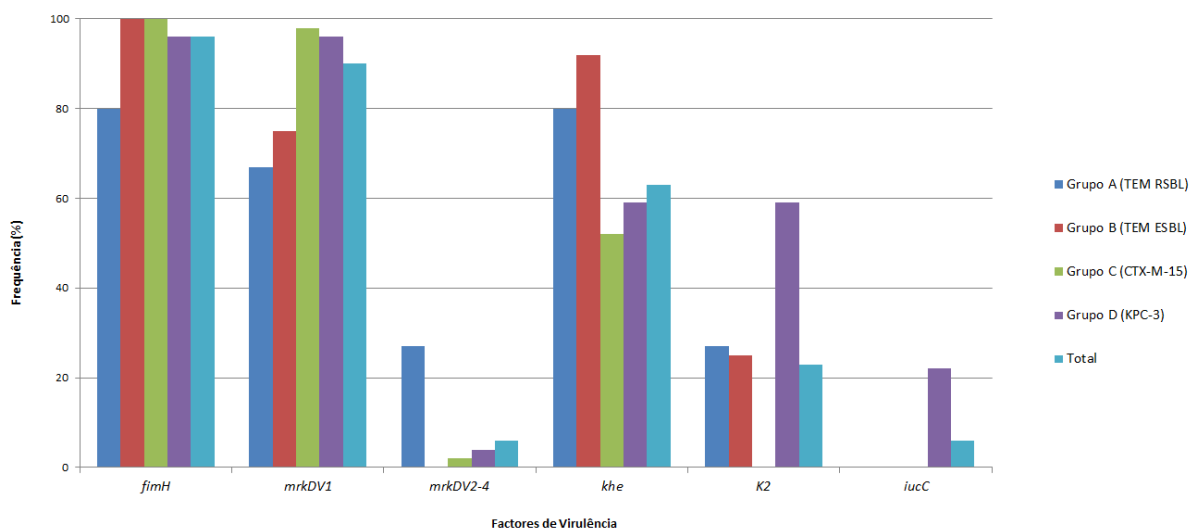
---

para a patogenicidade da *K. pneumoniae* dentro e fora do trato urinário. A hemolisina foi também identificada de forma mais significativa em isolados hospitalares isoladas em urinas do que nos restantes produtos biológicos ( $p=0,0006$ , IC95%). Assim, estes isolados associam a capacidade de aderência e persistência no organismo com uma complementaridade de acção entre estes factores de virulência, nomeadamente a hemolisina que permite uma acção citolítica que disponibiliza ferro para as bactérias e os sideróforos que garantem a sua eficiente captação.

### III.6. Relação entre o perfil de resistência e virulência dos isolados de *Klebsiella* spp.

Com o objectivo de verificar uma possível relação entre os factores de virulência identificados e o perfil de resistência aos antibióticos, importa analisar os resultados categorizados pelas distintas  $\beta$ -lactamases.

Os resultados são apresentados na Figura 14.



**Figura 14.** Frequência de distribuição dos factores de virulência de acordo com  $\beta$ -lactamases produzidas.

Legenda: *fimH*: fímbria do tipo 1; *mrkDV1*: fímbria do tipo 3 – variante 1; *mrkDV2-4*: fímbria do tipo 3 – variante 2-4; *khe*: hemolisina; *K2*: serotipo capsular K2; *iucC* - aerobactina

O gene *fimH*, que codifica para fímbrias do tipo 1 foi identificado em isolados de todos os Grupos, com uma frequência de isolamento de 80,0% (12/15, Grupo A), 96,3% (26/27, Grupo D) e 100,0% (Grupo B e C). Por sua vez, os genes codificantes para as fímbrias do tipo 3 tiveram comportamentos distintos de acordo com a variante para a qual codificam. A variante 1 foi identificada em todos os grupos, com uma frequência de 66,7% (10/15, Grupo A), 75,0% (9/12, Grupo B), 96,3% (26/27, Grupo D) e 97,8% (45/46, Grupo C). As variantes 2 a 4 foram identificadas somente no Grupo A (26,7%, 4/15) e em 1 isolado do



Grupo D (3,7%, 1/27) e Grupo C (2,1%, 1/46).

O gene que codifica para a hemolisina (*khe*) foi identificado em todos os Grupos, denotando-se uma prevalência superior no Grupo A (80,0%, 12/15) e Grupos B (91,7%, 11/12), comparativamente aos Grupos C e D (52,2%, 24/46) e (59,3%, 16/27). O gene que codifica para o serótipo capsular K2 foi identificado predominantemente no Grupo D (59,26%, 16/27), seguido do Grupo A (26,7%, 4/15) e B (25,0%, 3/12). Não se verificou a identificação do serótipo K2 no Grupo C. Finalmente, o gene que codifica para a aerobactina *iucC* foi identificada somente nos isolados do Grupo D (22,2%, 6/27).

De forma a verificar a possível existência de padrões de virulência característicos dentro de cada grupo de  $\beta$ -lactamase produzida, os resultados foram analisados também de acordo com a categorização dos isolados (Tabela 11). No Grupo A, contendo isolados produtores de TEM de espectro restrito, identificaram-se 7 padrões de virulência distintos, maioritariamente (86,7%, 13/15) agrupados em complexos de 2 ou 3 genes. Os padrões de virulência mais frequentemente encontrados são o *fimH,khe,mrkDV2-4* em 27% (4/15) dos isolados e o *khe,mrkDV1* em 20,0% (3/15). Note-se que estes padrões são característicos destes isolados uma vez que não são identificados de forma significativa ( $p<0,001$ ) em qualquer dos outros Grupos.

Os isolados do Grupo B, produtor de TEM de espectro alargado, apresenta 4 padrões de virulência distintos. O padrão mais frequente, identificado em 50,0% dos isolados (6/12) é o *fimH, khe, mrkDV1*. 17% dos isolados apresentam um padrão semelhante, ao qual acresce o tipo capsular K2 (*K2, fimH, khe,V1*). 25,0% dos isolados (3/12) apresentam o padrão *fimH, khe* o qual apenas foi identificado neste Grupo de isolados. O Grupo C, constituído por isolados produtores da  $\beta$ -lactamase de espectro alargado CTX-M-15 apresenta 3 padrões de virulência. Os mais frequentemente identificados foram o *fimH, khe,*

*mrkDV1* (em 50,0% dos isolados, 23/46) e o *fimH,mrkDV1* (em 47,8%, 22/46) dos isolados.

Os isolados do Grupo D, produtores de KPC-3 e com maior índice de resistência apresenta a coexistência de 9 padrões de virulência distintos, situação que não se verifica em qualquer outro Grupo. 59,2% dos isolados (16/27) apresentam complexos de 2 ou 3 genes, enquanto em 40,7% dos isolados (11/27) são identificados padrões de virulência com 4 ou 5 genes. Os padrões mais frequentes são: *K2,fimH,mrkDV1* (25,9%, 7/27) e *K2,fimH,khe,mrkDV1* (25,9%, 7/27).

**Tabela 11.** Perfil de virulência dos isolados de *K. pneumoniae* identificados em infecções hospitalares de acordo com  $\beta$ -lactamase produzida.

|                      |  | Grupo A<br>TEM RSBL | Grupo B<br>TEM ESBL | Grupo C<br>CTX-M-15 | Grupo D<br>KPC-3 |
|----------------------|--|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|
|                      |  | nº de isolados (%)  |                     |                     |                  |
| Padrão de virulência | Perfil de Virulência                           | 15 (100)            | 12 (100)            | 46 (100)            | 27 (100)         |
| 2 genes              | <i>fimH,mrkD<sub>V1</sub></i>                  | 2 (13,3)            | 0                   | 22 (47,8)           | 3 (11,1)         |
|                      | <i>khe, mrkD<sub>V1</sub></i>                  | 3 (20,0)            | 0                   | 0                   | 0                |
|                      | <i>fimH, khe</i>                               | 0                   | 3 (25,0)            | 0                   | 0                |
| 3 genes              | <i>fimH, khe,mrkD<sub>V1</sub></i>             | 2 (13,3)            | 6 (50,0)            | 23 (50,0)           | 4 (14,8)         |
|                      | <i>K2, fimH,mrkD<sub>V1</sub></i>              | 1 (6,67)            | 1 (8,3)             | 0                   | 7 (25,9)         |
|                      | <i>fimH, khe,mrkD<sub>V2-4</sub></i>           | 4 (26,7)            | 0                   | 1 (2,2)             | 0                |
|                      | <i>khe, mrkD<sub>V1</sub>, iucC</i>            | 0                   | 0                   | 0                   | 1 (3,7)          |
|                      | <i>fimH, mrkD<sub>V1</sub>, iucC</i>           | 0                   | 0                   | 0                   | 1 (3,7)          |
|                      | <i>K2, fimH,khe</i>                            | 1 (6,7)             | 0                   | 0                   | 0                |
|                      | <i>K2, fimH, khe,mrkD<sub>V1</sub></i>         | 2 (13,3)            | 2 (16,7)            | 0                   | 7 (25,9)         |
| 4 genes              | <i>fimH, khe,mrkD<sub>V1</sub>, iucC</i>       | 0                   | 0                   | 0                   | 2 (7,4)          |
|                      | <i>K2, fimH, khe,mrkD<sub>V1</sub>, iucC</i>   | 0                   | 0                   | 0                   | 1 (3,7)          |
| 5 genes              | <i>K2, fimH, khe,mrkD<sub>V2-4</sub>, iucC</i> | 0                   | 0                   | 0                   | 1 (3,7)          |

O estudo dos factores de virulência associados aos isolados produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado não é, até à data, esclarecedor.<sup>59,186</sup> Robin, F. *et al.* efectuaram estudos com isolados produtores de TEM e sugerem que a produção de poucos factores de virulência, em especial factores quelantes de ferro e produtores de cápsula são suficientes para potenciar a actividade nosocomial dos isolados, principalmente quando associados à produção de ESBL.<sup>59</sup> Um estudo que comparou isolados produtores da ESBL CTX-M com isolados não produtores de CTX-M menciona a falta de características partilhadas entre os dois grupos. Ensaio de conjugação confirmaram que é o plasmídeo com o gene *bla*CTX-M-15 que confere virulência e resistência antimicrobiana, indicando que os clones ST11 produtores de CTX-M-15 podem ter uma vantagem selectiva, mesmo sem pressão antibiótica.<sup>187</sup> Tzouveleakis, L. S. *et al.* estudaram a virulência de isolados produtores de KPC ST258 num modelo *in vivo*, classificando a estirpe como virtualmente avirulenta. Além disso, foi altamente suscetível à morte no soro e classificada como K41, serótipo que não está entre os tipos capsulares mais virulentos. Os resultados apoiam a teoria de que a alta mortalidade associada aos isolados KPC ST258 é em grande parte devido à resistência e, conseqüentemente, ao tratamento antimicrobiano ineficiente.<sup>188</sup>

Uma nova variante clínica emergiu na última década, tendo sido denominada de *K. pneumoniae* hipermucoviscosa. Estes isolados causam infeções severas em órgãos e com risco de vida em indivíduos saudáveis. Embora usualmente caracterizada como hipervirulenta,<sup>189-191</sup> a compreensão dos mecanismos de virulência que permitiram a evolução destes isolados é ainda limitada.<sup>192</sup> Estudos que efectuaram uma comparação com a *K. pneumoniae* não hipermucoviscosa determinaram uma maior propensão da *K. pneumoniae* hipermucoviscosa para adquirir resistência.<sup>189</sup> De forma concordante, é referido por outros autores que ocorre um aumento do potencial patogénico desta bactéria quando existe a identificação do factor de virulência aerobactina,<sup>192</sup> que codifica para a produção de sideróforos, com conseqüente aumento da produção destes.<sup>190</sup> Também El Fertat-Aissani, R. *et al.* mencionam que as

fímbrias do tipo 1 e tipo 3 foram encontradas de forma comum nos isolados de *K. pneumoniae* enquanto outros factores de virulência como a aerobactina, yersiniabactina e factor de hipermucoviscosidade constituem uma ameaça para as populações vulneráveis, principalmente se existir também resistência aos antibióticos.<sup>193</sup> A habilidade para adquirir ferro com mais eficiência e talvez a elevada produção capsular, poderá ser o que confere o fenótipo de hipermucoviscosidade,<sup>191</sup> ou de elevado potencial de virulência, fenótipo identificado no presente estudo nos isolados produtores de carbapenemases KPC-3.

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem referir que a frequência de identificação dos factores de virulência dos isolados de *K. pneumoniae* não apresenta uma relação directa com a tipologia de  $\beta$ -lactamase produzida. Assim, os isolados produtores de  $\beta$ -lactamases do espectro alargado são bactérias multiresistentes que se mantêm com actividade patogénica oportunista cuja complexidade de virulência acompanha o perfil de resistência. No entanto, constata-se uma superior identificação de aerobactina e do serótipo capsular K2 nos isolados produtores de KPC-3 comparativamente aos restantes isolados produtores de TEM e CTX ( $p < 0,0001$  IC95%). Foi assim, possível verificar que embora não se tratando de factores de virulência essenciais, estes isolados apresentam uma virulência reforçada, em especial nas estirpes produtoras de KPC-3. Concordante com os resultados obtidos no presente trabalho, um estudo com 22 isolados de *K. pneumoniae* produtores da carbapenemase KPC-2 no Brasil, reportou superior frequência de genes de virulência *mrkD*, *fimH* e *irp2* (gene envolvido na síntese do sideróforo yersiniabactina) comparativamente aos isolados não produtores de KPC.<sup>52</sup>

Embora não seja ainda consensual qual o modelo de virulência *in vivo* no qual os isolados produtores de carbapenemase KPC devem ser estudados, bem como se a virulência identificada pela acumulação de genes de virulência se reflecte numa superior mortalidade,<sup>194</sup> o presente trabalho indica que os isolados produtores de KPC-3 identificados num hospital central terciário em Lisboa apresentam uma acumulação

de genes de virulência e uma organização destes em perfis de virulência com maior complexidade. Estes factos, aliados à crescente multiresistência e consequentes limitações terapêuticas poderá também indiciar uma maior propensão para infecção de indivíduos jovens e saudáveis.<sup>195</sup>

Considerando os resultados obtidos no que infere à virulência dos isolados hospitalares, poderá ser realçado:

- Uma elevada frequência de factores de virulência fímbrias do tipo 1 e tipo 3, assim como hemolisina, nos isolados de *K. pneumoniae* produtores de  $\beta$ -lactamases identificados em ambiente hospitalar;
- Os isolados provenientes dos produtos biológicos secreções brônquicas, exsudados purulentos e sangue demonstraram similar perfil na identificação dos factores de virulência, enquanto os isolados provenientes das urinas apresentaram mais frequentemente os factores de virulência hemolisina e aerobactina.
- Os isolados de produtos clínicos e de colonização apresentam predominantemente a fímbria do tipo 3 variante 1 enquanto os isolados dos estudos de superfícies apresentam a variante 2-4, associada a maior capacidade de aderência e formação de biofilmes.
- Os padrões de virulência mais comuns consistem no agrupamento nos genes *fim*, *mrkDV1* com a presença ou ausência do gene *khe*, o qual codifica para uma hemolisina associada a quadros severos de infecção;
- Os isolados produtores da  $\beta$ -lactamase carbapenemase KPC-3, demonstraram um perfil de multiresistência aos carbapenemos, cefalosporinas, aminoglicosídeos (gentamicina) e fluoroquinolonas (ciprofloxacina), bem como uma superior complexidade nos padrões de virulência identificados, comparativamente aos restantes isolados não produtores de KPC-3.



**Estudo 2. Caracterização clonal de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores da cefotaximase CTX-M-15 e da carbapenemase KPC-3 em 5 hospitais de Lisboa e na comunidade**





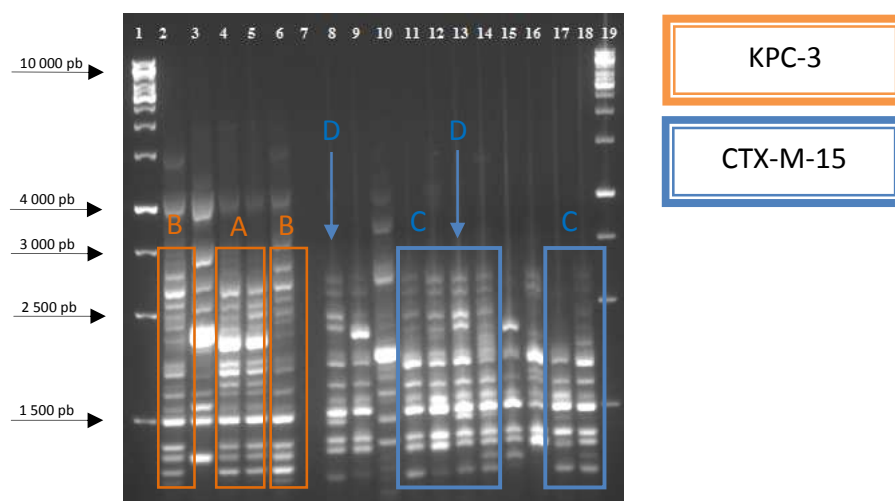
## Estudo 2. Caraterização clonal de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores da cefotaximase CTX-M-15 e da carbapenemase KPC-3 em 5 hospitais de Lisboa e na comunidade

No presente Estudo pretende-se efectuar uma caraterização clonal dos isolados de *K. pneumoniae* dentro do principal hospital no qual decorreu o Estudo 1, comparar o perfil clonal dos isolados entre distintos hospitais da mesma área geográfica, nomeadamente na Região de Lisboa, bem como comparar os isolados hospitalares e da comunidade produtores da mesma  $\beta$ -lactamase.

### III.7. Caraterização clonal da amostra

#### III.7.1. Perfil genéticos dos isolados produtores de CTX-M-15 e KPC-3

No presente trabalho, de modo a avaliar a relação clonal entre os isolados de *K. pneumoniae* em estudo, foi utilizada a técnica de M-13 *PCR fingerprinting*, como se encontra exemplificado na Figura 15.

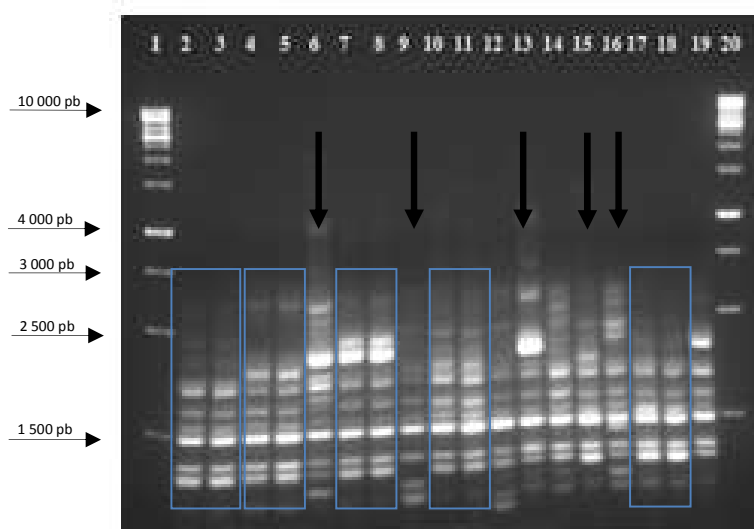


**Figura 15.** Determinação do perfil eletroforético *M13 fingerprinting* de isolados de *K. pneumoniae* produtores da  $\beta$ -lactamase de espectro alargado CTX-M-15 e carbapenemase KPC-3. Legenda: 1. Marcador Molecular (1kb); 2. Kp2564; 3. Kp2727; 4. Kp2833; 5. Kp2909; 6. Kp2908; 7. vazio; 8. Kp2539; 9. Kp2556; 10. Kp2584; 11. Kp2520; 12. Kp2590; 13. Kp2602; 14. Kp2692; 15. Kp2744; 16. Kp2844; 17. Kp2851; 18. Kp2890; 19. Marcador Molecular (1kb);

No presente trabalho foram identificados 22 perfis eletroforéticos distintos para a amostra estudada (n=100). Dos 100 isolados estudados, na Figura 15 estão representadas 16 estirpes representativas, nas quais se verificou a existência de 4 perfis electroforéticos. A variabilidade de perfis encontrados é evidenciada quando se tratam de isolados que partilham o mesmo perfil fenotípico (Estudo 1) e/ ou são produtores da mesma  $\beta$ -lactamase, como é o exemplo da KPC-3 que evidencia 2 genótipos distintos (A e B, identificados na Figura 15) e da CTX-M-15 (C e D), bem como quando se comparam os perfis entre os isolados produtores de KPC-3 e CTX-M-15 (A e B Vs C e D).

Em estudos prévios decorridos neste mesmo hospital, foi identificado um clone de *E. coli* predominante e persistente no Centro Hospitalar, enquanto que os isolados de *K.pneumoniae* provenientes de estudos de bacteriémias tinham já demonstrado significativa variabilidade genotípica.<sup>19</sup> Assim, o presente estudo corrobora a variabilidade do genótipo dos isolados de *K. pneumoniae* identificados no Centro Hospitalar de cuidados terciários em Lisboa, não obstante o perfil fenotípico que apresentem, a  $\beta$ -lactamase produzida, bem como a endemicidade dos isolados de CTX-M-15.

Importa também comparar os perfis genotípicos para isolados produtores de CTX-M-15 provenientes de distintos serviços no mesmo Centro Hospitalar, por forma a identificar se existe disseminação do mesmo perfil genético entre serviços. Os resultados são apresentados na Figura 16.



**Figura 16.** Perfil eletroforético por *M13 fingerprinting* de isolados de *K. pneumoniae* produtores de CTX-M-15 provenientes de distintos serviços hospitalares (Medicinas, Cuidados Intensivos, Cirurgia, Ambulatório) no mesmo Centro Hospitalar de cuidados terciários em Lisboa.

Legenda: 1. Marcador Molecular (1kb); 2. Kp2879; 3. Kp2880; 4. Kp2789; 5. Kp2808; 6. Kp2833; 7. Kp2845; 8. Kp2846;

9. Kp2491; 10. Kp2523; 11. Kp2524; 12. Kp2589; 13. Kp2612; 14. Kp2644; 15. Kp2664; 16. Kp2669; 17. Kp2765; 18. Kp2794;

19. Kp2853; 20. Marcador Molecular (1kb)

Não obstante a variabilidade nos perfis electroforéticos identificada nos isolados produtores da  $\beta$ -lactamase de espectro alargado CTX-M-15, representada na Figura 16 (setas a preto), pode também identificar-se o mesmo perfil genético em estirpes de *K. pneumoniae* provenientes de doentes diferentes de serviços hospitalares distintos (incluindo geograficamente dispersos), como evidenciam os quadrados azuis da imagem. A partilha do perfil genético ocorre não obstante a tipologia dos cuidados de saúde prestados, dado que é identificado o mesmo perfil genético em isolados provenientes de Ambulatório de

Cirurgia com Unidade de Cuidados Intensivos; Unidades de Medicina com Serviços Cirúrgicos (não se tratando da mesma especialidade clínica); Ambulatório e Cirurgia, bem como Cirurgia e Unidade de Cuidados Intensivos.

### III.7.2. Identificação clonal

As metodologias de diagnóstico e tipificação moleculares, assentes na pesquisa e análise de ácidos nucleicos, é hoje um inestimável auxiliar aos exames complementares de diagnóstico clínico. Para além da identificação das espécies presentes numa amostra, é por vezes necessário discriminar entre os indivíduos de uma mesma espécie, ou seja, distinguir isolados<sup>4</sup>. De forma a facilitar a comunicação de dados entre laboratórios, tem-se também apostado no desenvolvimento de métodos de tipificação baseados na sequenciação. Destes, destaca-se a tipificação por sequenciação de múltiplos *loci*, MLST.

#### III.7.2.1. Isolados produtores de CTX-M-15

Com o intuito de traçar um perfil evolutivo dos isolados produtores de CTX-M-15 ao longo dos anos em estudo, foram seleccionados 16 isolados, 8 dos quais isolados do Centro Hospitalar terciário em Lisboa no qual decorreu o Estudo 1 (H1). Foram também considerados isolados produtores de CTX-M-15 de outros hospitais da região Lisboa: H2 (n=1), H3 (n=2), H4 (n=2) e H5 (n=2). Para efeitos comparativos foi também estudado o isolado produtor de CTX-M-15 da comunidade identificado no Estudo 2, proveniente do Laboratório Nº 212-193, das Caldas da Rainha (n=1).

Os resultados apresentados na Tabela 12 evidenciam a presença de 6 clones distintos, os quais correspondem a 6 *Sequence Type*: ST-15 (68,8%, 11/16); ST-76 (6,3%, 1/16); ST-133 (6,3%, 1/16); ST-147

(6,3%, 1/16); ST-276 (6,3%, 1/16) e ST-307 (6,3%, 1/16). Verificou-se que 11 dos 16 isolados (68,8%) de *K. pneumoniae* produtores da ESBL CTX-M-15 pertencem ao ST-15, sendo este o clone predominante. O clone ST-15 foi identificado em estirpes produtoras de CTX-M-15 identificadas no ano de 2003 e que permaneceram pelo menos 5 anos (2003-2008) no mesmo hospital (H1), indicativo de uma situação endêmica. Este clone foi identificado em outras unidades de saúde da área geográfica de Lisboa, durante vários anos (2003-2011) e de tipologia variável, dado que foram incluídos isolados bacterianos de *K. pneumoniae* de quatro hospitais públicos, um hospital privado e de um laboratório da comunidade. Os resultados obtidos são compatíveis com a ocorrência de disseminação clonal entre unidades hospitalares, bem como com a comunidade.

O clone predominante no presente estudo (>50% dos isolados) foi o ST15, que é caracterizado na literatura como um clone intercontinental de elevado risco, sendo o principal clone associado à disseminação de isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores da cefotaximase de espectro alargado CTX-M-15.<sup>76,196,197</sup> Em Copenhaga (Dinamarca), foi reportado o clone epidémico de *K. pneumoniae* ST15 contendo os genes *bla*CTX-M-15 e *bla*SHV-8. Damjanova, I. *et al.* reportaram a rápida disseminação de isolados clínicos produtores de CTX-M-15 pertencendo aos clones epidémicos ST15, ST147 e ST11 resistentes à ciprofloxacina na Hungria.<sup>197</sup> Note-se que, no presente estudo o clone ST147 foi identificado em produtores de CTX-M-15 e o clone ST11 em produtores de KPC-3 (descrito no ponto seguinte). Também em Cuba foram reportados os clones ST15 e ST147, para além dos ST152, ST48,<sup>198</sup> comuns aos identificados em 2014 por Alouache, S. *et al.* que descrevem também a presença de produtores da  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 ST15, ST147, ST17, ST36, ST48 e ST54 à entrada e saída de uma estação de tratamento de águas residuais (ETAR) na Argélia.<sup>199</sup> Destaca-se assim, a relevância clínica do clone ST15 e a importância destes como fonte de disseminação de genes de resistência, não só no âmbito da prestação de cuidados de saúde, mas também no ambiente.

**Tabela 12.** Identificação ST dos isolados de *K.pneumoniae* produtores de CTX-M-15 por ano e local de isolamento.

| <i>K. pneumoniae</i> produtora de CTX-M-15<br>(n=16) |                      |     |
|--|----------------------|-----|
| Local de Isolamento                                  | Ano de identificação | ST  |
| H1   | 2003                 | 15  |
| H1   | 2004                 | 15  |
| H1   | 2005                 | 15  |
| H1   | 2005                 | 76  |
| H1   | 2007                 | 147 |
| H1   | 2008                 | 15  |
| H1   | 2008                 | 133 |
| H1   | 2008                 | 276 |
| H1   | 2008                 | 15  |
| H2   | 2009                 | 15  |
| Comunidade   | 2010                 | 15  |
|  | 2011                 | 15  |
| H3   | 2011                 | 15  |
| H4   | 2011                 | 15  |
| H5   | 2011                 | 15  |
| H3   | 2011                 | 15  |
| H4   | 2013                 | 307 |

Legenda: H1 – Hospital 1; H2 – Hospital 2; H3 – Hospital 3; H4 – Hospital 4; H5 – Hospital 5;

### III.7.2.2. Isolados produtores de KPC-3

Todos os isolados produtores de KPC-3 são provenientes do Centro Hospitalar terciário em Lisboa no qual decorreu o Estudo 1, dado que à data eram os únicos isolados de KPC-3 identificados em Portugal. Para além da identificação dos ST destes isolados foi efectuada a comparação dos *locus* dos clones com os obtidos para os isolados produtores de CTX-M-15 que co-existiam no mesmo hospital. Na Tabela 13 são apresentados os resultados.

**Tabela 13.** Variação clonal dos isolados de *K. pneumoniae* identificados.

| $\beta$ -lactamase produzida | ST  | <i>gapA</i> | <i>infB</i> | <i>mdh</i> | <i>pgi</i> | <i>phoE</i> | <i>rpoB</i> | <i>tonB</i> |
|------------------------------|-----|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| KPC-3                        | 11  | 3           | 3           | 1          | 1          | 1           | 1           | 4           |
|                              | 14  | 1           | 6           | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |
|                              | 15  | 1           | 1           | 1          | 1          | 1           | 1           | 1           |
|                              | 133 | 12          | 1           | 1          | 5          | 5           | 1           | 36          |
| CTX-M-15                     | 276 | 2           | 1           | 1          | 1          | 1           | 4           | 18          |

O primeiro isolado de KPC-3 identificado em Portugal, no ano de 2009, apresentou o tipo clonal ST11. No entanto, os restantes isolados estudados (n=3) pertencem ao clone ST14, o qual difere do ST11 em 3 *locus* clonais (Tabela 13). Verifica-se, portanto, que não ocorreu disseminação deste clone identificado como clone internacional de alto risco.<sup>200</sup> É também possível verificar que o clone ST14 apresenta diferença de quatro *locus* para o clone ST276 e de cinco *locus* para o clone ST133. No entanto, no que infere à comparação do ST14 com o ST15 verifica-se apenas a variação de um único *locus* do clone de elevada disseminação de CTX-M-15.

Estudos em países asiáticos reportam o clone ST11 como predominante em isolados produtores de CTX-M-14 e CTX-M-15 causadores de ITU e bacterémia.<sup>201,202</sup> No entanto, este clone não foi ainda detectado em *K. pneumoniae* produtores de KPC-3. Recentemente, Ramos *et al.* identificaram o clone ST11 no Brasil, embora em isolados produtores de KPC-2.<sup>203</sup> Também o clone ST14 não foi detectado em *K. pneumoniae* produtoras de KPC-3. Actualmente, a disseminação global de *K. pneumoniae* carbapenemase do tipo 3 (KPC-3) é predominantemente associada a isolados de *K. pneumoniae* ST258.<sup>204</sup> A primeira KPC ST258 foi descrita em Israel embora a forma como se verificou a disseminação para o resto do mundo permaneça ainda desconhecida.<sup>204</sup> Também na Europa, assim como em isolados produtores de KPC-2 tem sido este o clone mais frequentemente identificado, embora novos clones comecem a ser descritos.<sup>198,205</sup> Em 2013 foi identificado o clone ST512 associado a *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases KPC-3 com disseminação intra e inter-hospitalar no norte da Itália, clone posteriormente identificado também na República Checa.<sup>206</sup> Por sua vez, em Espanha o estudo da epidemiologia de *K. pneumoniae* produtores de KPC-3 em 2010 determinou a existência do ST384 e ST388<sup>168</sup> enquanto em 2013 foram identificados três clones: ST454, ST659 e ST971 num hospital universitário em Madrid.<sup>170</sup> Em nenhum dos estudos foi identificado o ST14.

A variabilidade clonal dos isolados produtores da carbapenemase KPC identificados em todo o mundo, associada à capacidade de transferência plasmídica horizontal, produzem um quadro epidemiológico complexo que deve ser monitorizado. O presente trabalho demonstra que o gene *blaKPC-3* é identificado em isolados do clone ST11 e permanece no mesmo centro hospitalar na linhagem ST14, distinta da que é mundialmente mais frequente, ST258.

A carbapenemase NDM-1, não foi identificada em Portugal até à data, tem sido recentemente referenciada em perfis clonais ST11, ST147<sup>207,208</sup> e ST263.<sup>209</sup> No entanto, é a *K. pneumoniae* ST14, já



identificada na Índia, Reino Unido e Suécia em isolados produtores de NDM-1, de forma isolada e em associação com outras  $\beta$ -lactamases (CTX-M-15, SHV-28, OXA-1, OXA-9 and TEM-1),<sup>210</sup> que tem sido descrita com um elevado potencial para causar surtos, não só devido à sua distribuição internacional mas também pelos marcadores de resistência aos antibióticos que lhe estão associados,<sup>211</sup> chegando mesmo a ser mencionada como o novo MRSA.<sup>197</sup> A identificação de clones de alto risco, como demonstram ser os clones ST15 nos produtores de CTX-M-15 e o clone ST14 nos isolados produtores de KPC-3, pelos resultados apresentados na presente tese, desempenham um papel importante na propagação clonal de resistência, bem como uma considerável capacidade para acumular determinantes de resistência e virulência. Assim, os resultados obtidos na presente tese, no que infere à caracterização genotípica dos isolados reforçam a importância do conhecimento e monitorização clonal dos isolados de *K.pneumoniae* multirresistentes produtores de CTX-M-15 e de KPC-3, principalmente no que infere à sua capacidade de persistência e disseminação inter e intra hospitalar, bem como a disseminação de e para a comunidade.



### **Estudo 3. Ocorrência e Diversidade de $\beta$ -lactamases em espécies produtoras de carbapenemases**



### Estudo 3. Determinação da ocorrência e diversidade de $\beta$ -lactamases em espécies Gram-negativo resistentes aos carbapenemos num hospital terciário em Lisboa

#### III.8. Identificação de $\beta$ -lactamases

No âmbito da presente tese foi conduzido um estudo de monitorização de isolados resistentes aos carbapenemos, de forma a perceber a capacidade de disseminação da enzima KPC-3, identificada pela primeira vez em Portugal num isolado de *K. pneumoniae*. As estirpes foram isoladas entre Janeiro de 2010 e Junho de 2011, encontrando-se os resultados apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Diversidade de  $\beta$ -lactamases produzidas associadas à KPC-3, por espécie bacteriana.

| Espécie                        | KPC e $\beta$ -lactamases adicionais | número total |                 |
|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------|
|                                |                                      | isolados (%) | nº isolados (%) |
| <i>K. pneumoniae</i>           | KPC-3                                |              | 16 (59,2)       |
|                                | KPC-3, SHV-11                        |              | 4 (14,8)        |
|                                | KPC-3, SHV-35                        |              | 1 (3,7)         |
|                                | KPC-3, CTX-M-15                      | n=27 (100)   | 6 (22,2)        |
| <i>K. oxytoca</i>              | KPC-3, DHA-1                         |              | 2 (28,6)        |
|                                | KPC-3, SHV-12                        |              | 4 (57,1)        |
|                                | KPC-3, SHV-12, DHA-1                 | n=7 (100)    | 1 (14,3)        |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>  | KPC-3, TEM-1                         |              | 1 (50,0)        |
|                                | KPC-3, SHV-1                         | n=2 (100)    | 1 (50,0)        |
| <i>Escherichia coli</i>        | KPC-3, TEM-1, SHV-1                  | n=2 (100)    | 2 (100,0)       |
| <i>Citrobacter freundii</i>    | KPC-3, TEM-1, SHV-1                  | n=1 (100)    | 1 (100,0)       |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | KPC-3, TEM-1, SHV-1                  | n=1 (100)    | 1 (100,0)       |

Os isolados mais frequentemente identificados com a enzima KPC-3 foram *K. pneumoniae* (n=27), seguidos de *K. oxytoca* (n=7), *E. coli* (n=2), *Enterobacter aerogenes* (n=2) e, por fim, *Citrobacter freundii* e

*Acinetobacter baumannii* (n=1, cada). Os resultados indiciam a identificação do gene KPC-3 em outras espécies clinicamente significativas que não apenas a *K. pneumoniae*, embora esta se mantenha como a mais frequentemente associada a esta carbapenemase. Outros estudos com KPC-2 e NDM-1<sup>212</sup> mencionam a disseminação plasmídica entre distintas espécies e géneros bacterianos. Também no que infere à diversidade dos genes produzidos, verifica-se a existência de uma facilidade de adaptação nos isolados de *Klebsiella* spp., dada a acumulação de complexidade genética associada aos determinantes genéticos de resistência nestes isolados.

Uma nova associação de KPC-3 com a cefalosporinase DHA-1 é descrita pela primeira vez. Esta identificação ocorreu em isolados de *K. oxytoca* nos quais foi verificada a existência de KPC-3 e DHA-1 (29%), KPC-3, DHA-1 e SHV-12 (14%) e KPC-3, SHV-12 (57%). A associação DHA-1 e KPC, já antes identificada em isolados produtores de KPC-2, aumenta a resistência dos isolados para a cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, aztreonam em relação o isolados que codificam apenas para a carbapenemase.<sup>213,214</sup> A SHV-12 difere da SHV-1 por substituição de três aminoácidos e aumenta a resistência dos isolados à ceftazidima e cefotaxima, tendo anteriormente sido encontrada num plasmídeo com a KPC-2 em França.

A associação das  $\beta$ -lactamases SHV-1 e TEM-1 com a carbapenemase KPC-3, de forma isolada ou conjunta, é observada para 15% (6/40) dos isolados produtores desta carbapenemase, tendo sido identificada em isolados de *E. coli*, *E. aerogenes*, *C. freundii* e *A. baumannii*. Estas  $\beta$ -lactamases, encontradas frequentemente em *Enterobacteriaceae* desde a introdução de cefalosporinas de largo espectro na terapêutica, conferem resistência às penicilinas e às cefalosporinas de 1ª geração.

Pela primeira vez em Portugal, é identificada a carbapenemase KPC em isolados de *Citrobacter freundii* e

*Acinetobacter baumannii*, ambos com as enzimas KPC-3, TEM-1 e SHV-1. A estirpe de *C. freundii* foi isolada num doente de 91 anos, do sexo feminino. O doente deu entrada num Centro Hospitalar terciário em Lisboa a 06 de Abril com AVC hemorrágico, tendo sido administrada terapêutica com cefuroxime. Posteriormente, foi diagnosticada uma infecção urinária com *Enterococcus* spp., para a qual se efectuou terapêutica com nitrofurantoína. Em Abril apresentou situação clínica de distúrbio gastrointestinal, tendo sido alterada a antibioterapia para piperacilina/tazobactam. No mesmo mês é efectuado o isolamento do *C. freundii* numa amostra de urina, num serviço de Medicina. O isolado era resistente a todos os carbapenemos testados (imipenemo, meropenem e ertapenem), tendo o doente acabado por falecer.

Por sua vez, a estirpe de *Acinetobacter baumannii* foi isolada numa doente de 35 anos, sexo feminino, com história clínica de insuficiência renal e imunossupressão. Em Janeiro de 2011 é submetida a uma gastroenterostomia. Fez terapêutica com ciprofloxacina, linezolida e meropenem. Em Fevereiro é isolada a estirpe *K. pneumoniae*. No início de Março é novamente submetida a uma cirurgia no mesmo serviço hospitalar e no fim do mesmo mês é identificada a estirpe de *A. baumannii*. Ambos os produtos biológicos provêm de exsudados purulentos e foram identificados no serviço de cirurgia. O *A. baumannii* apresenta um perfil de multiresistência aos 10 antimicrobianos estudados, incluindo tigeciclina e colistina (Tabela 15), diferenciando-se do isolado de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase apenas pela sensibilidade à colistina. A doente faleceu.

**Tabela 15.** Caracterização fenotípica dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* produtores de KPC-3.

| Amostra  | Estirpe bacteriana   | Data da colheita | Produto biológico  | Perfil de susceptibilidade |     |     |     |     |    |     |     |     |    |
|----------|----------------------|------------------|--------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|----|
|          |                      |                  |                    | AMC                        | CTX | FOX | CAZ | CIP | GM | IMP | MEM | TGC | CS |
| ID 69633 | <i>K. pneumoniae</i> | 09-02-2011       | exsudado purulento | R                          | R   | R   | R   | R   | R  | R   | R   | R   | S  |
| ID 86982 | <i>A. baumannii</i>  | 29-03-2011       | exsudado purulento | R                          | R   | R   | R   | R   | R  | R   | R   | R   | R  |

Legenda: amoxicilina/ácido clavulânico (AMC); cefotaxima (CTX); ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GM), imipenemo (IMP), meropenem (MEM); tigeciclina (TGC), colistina (CS).

Em ambos os isolados foram identificados os genes codificantes das enzimas KPC-3, SHV-1 e TEM-1. No que infere ao perfil de virulência, o isolado de *K. pneumoniae* apresentava o serótipo K2 e os genes *fimH*, *khe*, *mrkdV1* e *iucC*. O ambiente genético do gene *blaKPC-3* foi caracterizado pela pesquisa dos genes associados ao transposão *Tn4401*, frequentemente associado à disseminação do gene *blaKPC-3*. O transposão *Tn4401b* (constituído pelos genes *ISKpn6*, *ISKpn7* e *tnpA*) foi identificado em ambos os isolados. Também o grupo de incompatibilidade *IncFrepB* foi nos isolados de *A. baumannii* e *K. pneumoniae*.

O presente estudo descreve a potencial capacidade de disseminação horizontal do gene *blaKPC-3* encontrado no isolado de *K. pneumoniae* por um elemento genético móvel idêntico, a isoforma *Tn4401b* que está associada com alta resistência a carbapenemos,<sup>215,216</sup> propagada por um único tipo de plasmídeo, o *IncFrepB*. Adicionalmente, os isolados de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* encontrados no mesmo paciente partilharam a mesma origem de replicação plasmídica (*IncFrepB*), que é indicativa de uma potencial disseminação horizontal entre estas distintas espécies.<sup>50,162,217</sup> Estes resultados, associados à elevada resistência e potencial de disseminação dos isolados de *A. baumannii* reforçam a necessidade de implementar medidas de controlo à emergência e disseminação de isolados produtores de KPC.



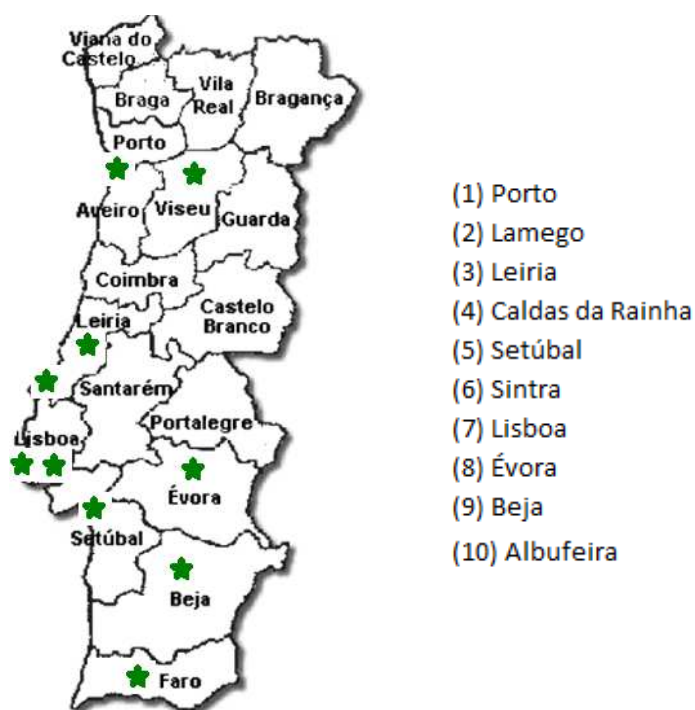
**Estudo 4. Caracterização dos determinantes de resistência e virulência de estirpes de *Klebsiella* spp. isoladas em Infecções do Trato Urinário (ITU) na comunidade e no hospital**



**Estudo 4.** Caraterização dos determinantes de resistência e virulência de estirpes de *Klebsiella* spp. isoladas em Infecções do Trato Urinário (ITU) na comunidade e no hospital

### III.9. Etiologia da infecção do trato urinário adquirida na comunidade (ITU-AC)

Foram identificadas 1087 amostras de urina durante o período de tempo compreendido entre Fevereiro e Março de 2010. A amostra inicial foi constituída por todos os isolados bacterianos provenientes de indivíduos com infeções do trato urinário adquiridas na comunidade (ITU-AC), identificados laboratorialmente através de urocultura em 10 laboratórios de análises clínicas da comunidade e localizados em: Setúbal, Beja, Sintra, Lisboa, Évora, Albufeira, Caldas da Rainha, Leiria, Porto e Lamego (Figura 17).



**Figura 17.** Distribuição geográfica dos laboratórios de análises clínicas da comunidade.

Os dados referentes à etiologia da infecção urinária da comunidade são apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16.** Distribuição das bactérias identificadas em uroculturas provenientes de ITU da comunidade.

| Agente etiológico                   | Frequência de isolamento (%) |
|-------------------------------------|------------------------------|
|                                     | n=1087                       |
| <i>Escherichia coli</i>             | 753 (69,3)                   |
| <i>Klebsiella</i> spp.              | 98 (9,0)                     |
| <i>Proteus</i> spp.                 | 75 (6,9)                     |
| <i>Enterococcus faecalis</i>        | 37 (3,4)                     |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 17 (1,6)                     |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>     | 17 (1,6)                     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       | 16 (1,5)                     |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>       | 15 (1,4)                     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | 11 (1,0)                     |
| Total                               | 1039 (95,6)                  |

Os nove agentes etiológicos mais frequentemente associados às ITU-AC (representando, no mínimo, 1% do total da amostra) representam 95,6% (1039/1987) do total dos isolados bacterianas identificadas. As estirpes de *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp., da família das *Enterobacteriaceae*, constituem 85,2% da amostra em estudo (926/1087). O agente etiológico predominante nas infecções urinárias na comunidade foi a *E. coli* (69,3%; 753/1087), seguido da *Klebsiella* spp. com 9,0% (98/1087) e dos isolados de *Proteus* spp., que representam 6,9% (75/1087) da amostra. *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* foram identificados em, respectivamente, 6,4% (70/1087) e 5,3% (57/1087) da amostra total. As bactérias Gram positivas *Enterococcus faecalis* foram identificadas em 3,4% (37/1087), enquanto *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus agalactiae* representam 1,6% (17/1087). Os isolados Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *E. aerogenes* foram identificados em 1,5% (16/1087) e 1,4% (15/1087) da amostra. Finalmente, o agente etiológico *Staphylococcus aureus* representa 1,0% da amostra (11/1087) e foi identificado em onze isolados, um destes classificado pelo laboratório de origem como resistente à metilicina (MRSA).

As infecções do trato urinário (ITU) encontram-se entre as doenças infecciosas mais prevalentes na população em geral,<sup>218</sup> podendo ser infecções adquiridas na comunidade (ITU-AC) ou no hospital (ITU-AH), ambas com importantes implicações no âmbito da saúde pública.<sup>219</sup> No presente estudo, os três agentes etiológicos mais prevalentes nas ITU-AC foram a *E. coli*, a *Klebsiella* spp. e o *Proteus* spp., à semelhança do reportado em outros estudos nacionais<sup>220,221</sup> e internacionais.<sup>80,97,222</sup>

A *E. coli* é o agente etiológico predominante em situações clínicas de infecções do trato urinário (ITU) na comunidade, apresentando uma frequência de isolamento neste estudo concordante com os resultados obtidos por outros autores que apresentam prevalências compreendidas entre 47%<sup>223</sup> e 83%.<sup>224</sup> Os isolados de *Klebsiella* spp. foram o segundo agente mais frequente, o qual esteve na origem de 9,0% das infecções. Embora estudos internacionais com isolados associadas às ITU-AC reportem valores compreendidos entre 3,5%<sup>225</sup> e 21,8%,<sup>97</sup> no presente estudo verifica-se existir uma superior prevalência de *K. pneumoniae* em Portugal comparativamente a outros países da Europa, que reportam 5,6% em Itália e 6,7% na Holanda.<sup>226,227</sup>

*Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foram identificados em 1,5% e 1,0% da amostra, valores inferiores aos já descritos no norte do país (2,4%-4,4% e 3,1-6,0%, respectivamente).<sup>228-230</sup> Este facto poderá ser explicado tendo em conta que as urinas do presente estudo são provenientes de doentes de várias localidades do país, não reflectindo desta forma possíveis assimetrias locais ou regionais. No entanto, a prevalência destes isolados na comunidade devem ser acompanhadas, dada a sua frequente associação o isolados multiresistentes.<sup>231,232</sup>

### III.10. *Klebsiella* spp. em infeções do trato urinário adquiridas na comunidade

#### Prevalência local e regional

Foi efectuado o estudo da prevalência dos isolados de *Klebsiella* spp. por laboratório e região, cujos resultados se encontram reflectidos na Tabela 17.

**Tabela 17.** Prevalência de *Klebsiella* spp. de acordo com as localidades e regiões nas quais se inserem os laboratórios de análises clínicas da comunidade nos quais foram identificados os isolados bacterianos.

| ID Laboratório | Região   | Localização do Laboratório | Nº de isolados de <i>Klebsiella</i> spp. | Nº Total de isolados | Prevalência de <i>Klebsiella</i> spp. (%) |
|----------------|----------|----------------------------|--|----------------------|---|
| 225            | Norte    | Porto                      | 12                                       | 150                  | 8,0%                                      |
| 228            |          | Lamego                     | 6  | 96                   | 6,3%                                      |
| 213            | Centro   | Leiria                     | 4  | 40                   | 10,0%                                     |
| 212            |          | Caldas da Rainha           | 11                                       | 100                  | 11,0%                                     |
| 201            | Lisboa   | Setúbal                    | 19                                       | 195                  | 9,7%                                      |
| 204            |          | Sintra                     | 9  | 94                   | 9,6%                                      |
| 206            |          | Lisboa                     | 12                                       | 100                  | 12,0%                                     |
| 208            | Alentejo | Évora                      | 4  | 67                   | 6,0%                                      |
| 203            |          | Beja                       | 14                                       | 146                  | 9,6%                                      |
| 209            | Algarve  | Albufeira                  | 7  | 99                   | 7,1%                                      |
| TOTAL          |          |                            | 98                                       | 1087                 | 9,0%                                      |

A prevalência de *Klebsiella* spp. em ITU-AC identificada no presente trabalho foi de 9,0%, valor superior aos 8% reportado em 2009,<sup>230</sup> embora os resultados demonstrem a existência de variabilidade a nível local (6,0% em Évora a 12,0% em Lisboa). Os valores mais baixos foram identificados na cidade de Évora (6,0%), seguida de Lamego (6,3%) e Albufeira (7,1%). As prevalências mais elevadas foram identificadas na região de Lisboa (9,6%-12,0%) e na região Centro (10,0%-11,0%), sendo que em todas as localidades

se verificou uma prevalência superior ou igual a 6,0%, indicador da importância deste microrganismo na patogénese das ITU. O facto de se tratar de um estudo multicêntrico permite obter um conhecimento mais amplo do que o obtido em estudos locais, reportado por outros autores.<sup>221,228,229</sup> Em Portugal, com excepção da região Centro - Pinhal Litoral, que compreende os concelhos de Batalha, Leiria, Marinha Grande, Pombal e Porto de Mós, e que apresenta uma prevalência de 12,0%,<sup>221</sup> foram descritas prevalências de 7,5% na região do Vale do Sousa e Tâmega<sup>229</sup> e de 7,9% em Bragança.<sup>228</sup>

### III.10.1 Caracterização do hospedeiro

#### Caraterização do Hospedeiro em situações de ITU por isolados da comunidade

De forma a caracterizar as variáveis demográficas da amostra de isolados da comunidade e identificar variáveis clínicas específicas do estudo, nomeadamente associadas a factores de risco em situações de ITU, foi efectuado um inquérito aos indivíduos com episódios de ITU na comunidade. Após solicitada a participação no estudo, os laboratórios procederam à recolha de informação do hospedeiro em folhas de registo de uma forma anónima e confidencial.

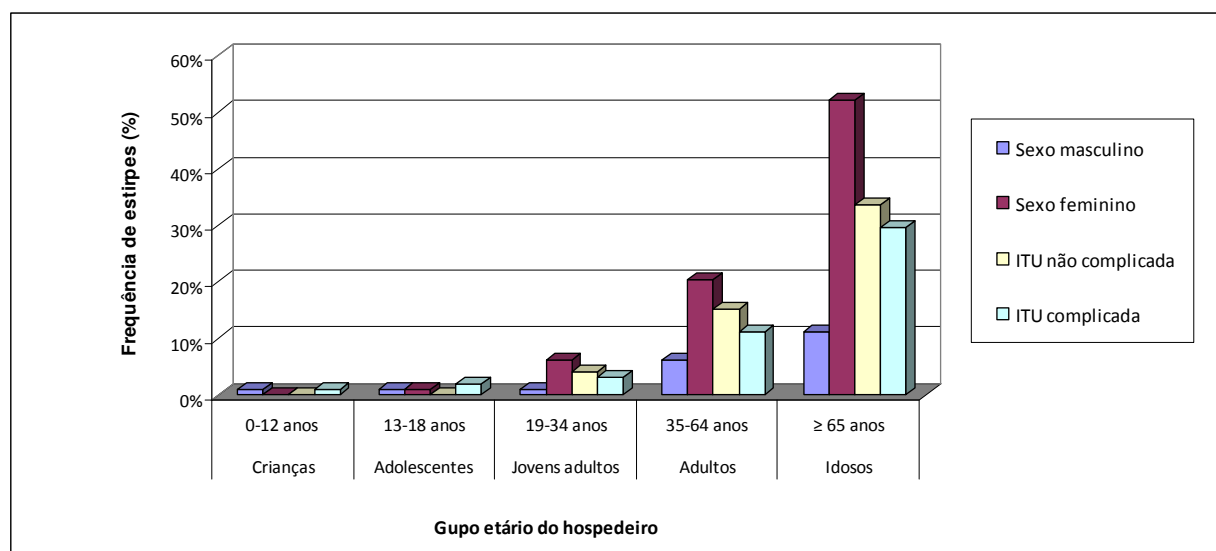
A folha de registo de dados foi desenvolvida especificamente para este estudo, contendo nove perguntas: seis fechadas com duas opções de resposta e três perguntas abertas. As perguntas tinham como objectivo caracterizar as variáveis demográficas da amostra e identificar variáveis clínicas específicas do estudo, associadas a seis factores de risco associados ao hospedeiro em situações de ITU, nomeadamente: idade superior ou igual a 65 anos, sexo masculino, encontrar-se em situação de gravidez, ter a patologia *diabetes mellitus*, encontrar-se algaliado ou acamado e, finalmente, ter apresentado múltiplas infeções do trato urinário no último ano.

Foram, assim, estudadas as seguintes variáveis:

- Sexo (feminino, masculino);
- Tipo de infecção urinária (não complicada, complicada);
- Estado de gravidez (sim, não);
- Patologia *diabetes mellitus* (sim, não);
- Acamado (sim, não);
- Algaliado (sim, não);
- Idade (anos completos);
- Nº de ITU por ano;

As respostas obtidas foram codificadas e registadas numa matriz inserida no programa informático *Microsoft Office Excel 2007*.

A média de idades dos hospedeiros com ITU por isolados de *Klebsiella* spp. foi de 64,6 anos, sendo o desvio padrão de 20,6 anos e a mediana de 70,5 anos. Os hospedeiros apresentaram idades compreendidas entre os 0,4 e os 93 anos. A caracterização demográfica dos isolados de *Klebsiella* spp. por grupo etário, categoria de infecção e sexo encontra-se na Figura 18.



**Figura 18.** Caracterização demográfica dos isolados de *Klebsiella* spp. por grupo etário, categoria de



infecção e sexo em infecções do trato urinário da comunidade.

Setenta e oito episódios de ITU ocorreram em indivíduos do sexo feminino (79,6%) dos quais cinquenta e um (52,0%) em idosos, vinte (20,4%) em adultos e seis (6,1%) em jovens adultos. Apenas uma situação foi identificada em adolescentes do sexo feminino (1,0%), não se verificando infecções em crianças até aos 12 anos. No que infere aos indivíduos do sexo masculino, foram identificadas dezanove situações (19,4%), com uma prevalência superior em idosos (11,2%; 11/98) e adultos (6,1%; 6/98) comparativamente aos jovens adultos, adolescentes e crianças nos quais foi identificado uma situação (1%; 1/98) em cada grupo etário. No que infere à tipologia de infecção, verifica-se que 53,1% (52/98) das infecções foram categorizadas pelo laboratório de origem como não complicadas, enquanto 46,9% (46/98) dizem respeito a ITU complicadas. As infecções não complicadas ocorreram em hospedeiros idosos (33,7%; 33/98), adultos (15,3%; 15/98) e jovens adultos (4,1%; 4/98) enquanto as ITU complicadas foram identificadas em todos os grupos etários, nomeadamente nos idosos (29,6%; 29/98), adultos (11,2%; 11/98), jovens adultos (3,1%; 3/98), adolescentes (2,0%; 2/98) e crianças (1,0%; 1/98).

Os factores de risco identificados foram a idade superior a 65 anos (63,3%; 62/98), ocorrência de infecções recorrentes (20,4%; 20/98) e a presença de *diabetes mellitus* (12,2%; 12/98). 20,4% (20/98) dos hospedeiros nos quais foram isolados estirpes de *Klebsiella* spp. apresentaram ITU recorrentes (ITU-r). Todas as situações de ITU-r foram identificadas em hospedeiros com ITU complicadas (ITU-c). Vinte e um (21,4%) indivíduos apresentaram, no mínimo, duas ITU no ano anterior à realização deste estudo, sendo que quarenta e quatro (44,9%) descrevem mais do que uma ocorrência de ITU no último ano. Três indivíduos (3,1%) encontravam-se acamados e dois indivíduos eram mulheres grávidas (2,0%). Nenhum dos hospedeiros se encontrava algaliado com sonda vesical.

As infecções do trato urinário são a tipologia de infecção bacteriana mais frequente na comunidade,

afectando de forma mais frequente as mulheres por possuírem a uretra com menores dimensões do que os homens, facilitando desta forma o acesso das bactérias à bexiga. No presente estudo (Tabela 18), os hospedeiros são maioritariamente mulheres não grávidas e sem patologia de *diabetes mellitus*. É desconhecida a existência de outras patologias. Os hospedeiros apresentam idades compreendidas entre os 15 e os 91 anos (idade média de 66 anos). Embora existam múltiplos factores que podem contribuir para que uma infecção urinária seja classificada como complicada, o factor mais importante quando considerado isoladamente é a idade avançada dado que 66% dos hospedeiros têm mais de 65 anos.

**Tabela 18.** Caraterização da Infecção do Trato Urinário (ITU) na comunidade: tipologia de infecção e factores de risco do hospedeiro

| Características do Hospedeiro          | Nº total de indivíduos (%)<br>n=98 (100,0%) |
|--|---|
| <b>Tipo de ITU</b>                     |   |
| Complicada                             | 46 (46,9)                                   |
| Não complicada                         | 52 (53,1)                                   |
| <b>Factor de risco</b>                 |   |
| ≥ 65 anos                              | 62 (63,3)                                   |
| Gravidez                               | 2 (2,0)                                     |
| <i>Diabetes mellitus</i>               | 12 (12,2)                                   |
| Algaliação                             | 0   |
| Acamado                                | 3 (3,1)                                     |
| ≥ 1 ITU no último ano                  | 44 (44,9)                                   |
| ≥ 2 ITU no último ano                  | 21 (21,4)                                   |
| ITU-recorrente (≥ 3 ITU no último ano) | 20 (20,4)                                   |

Existem numerosas alterações funcionais e patologias debilitantes associadas à idade que funcionam como factores potenciais para o desenvolvimento de infeções urinárias complicadas. Na amostra em estudo, 44% (22/50) das situações clínicas foram classificadas como infeções complicadas (ITU-c), sendo

que 96% (48/50) destas ocorreram em hospedeiros com mais de 65 anos. Nenhum dos hospedeiros se encontrava acamado ou algaliado com sonda vesical. Desconhece-se, no entanto, a proveniência dos doentes, nomeadamente o acompanhamento temporário por instituições de saúde ou residência em instituições geriátricas, como as Unidades de Cuidados Continuados (UCC) ou Lares. Os doentes residentes em instituições geriátricas apresentam um risco particularmente mais elevado dado que as sondas vesicais prolongadas ou o facto do doente permanecer acamado por longos períodos pode levar ao desenvolvimento de bexiga atónica. Estes doentes estão também mais expostos a infeções nosocomiais dadas o contacto mais frequente com as unidades hospitalares. Assim, a análise dos factores de risco, patologias e idade do hospedeiro devem ser factores a considerar pelos clínicos na escolha da antibioterapia, distinguindo a terapêutica administrada em situações de infeções urinárias não complicadas em mulheres jovens das ITU complicadas.

Por definição, as infecção do trato urinário recorrentes (ITUr) são as que ocorrem com uma frequência igual ou superior a 3 episódios no espaço de 1 ano ou igual ou superior a 2 episódios se ocorridos nos últimos 6 meses. 12% (6/50) dos hospedeiros nos quais foram isoladas Kp apresentaram ITU recorrentes (ITU-r), tendo sido identificados pelo menos 3 episódios de ITU nos últimos 12 meses. Todas as situações de ITU-r foram identificadas em hospedeiros com ITU-c. No entanto, se considerarmos no mínimo uma segunda infecção dentro de um ano os valores sobem para os 36% (18/50), valor que se aproxima do reportado na literatura que quase metade das mulheres apresentam uma segunda infecção no espaço de um ano.<sup>61</sup> Importa efectuar um estudo detalhado das características moleculares dos microrganismos que desencadeiam esta situação, dado que as ITU-r têm um grande impacto na qualidade de vida do hospedeiro bem como no sistema nacional de saúde, em virtude dos elevados custos que acarretam, nomeadamente absentismo laboral, medicação e aumento dos recursos como consultas médicas e exames clínicos.

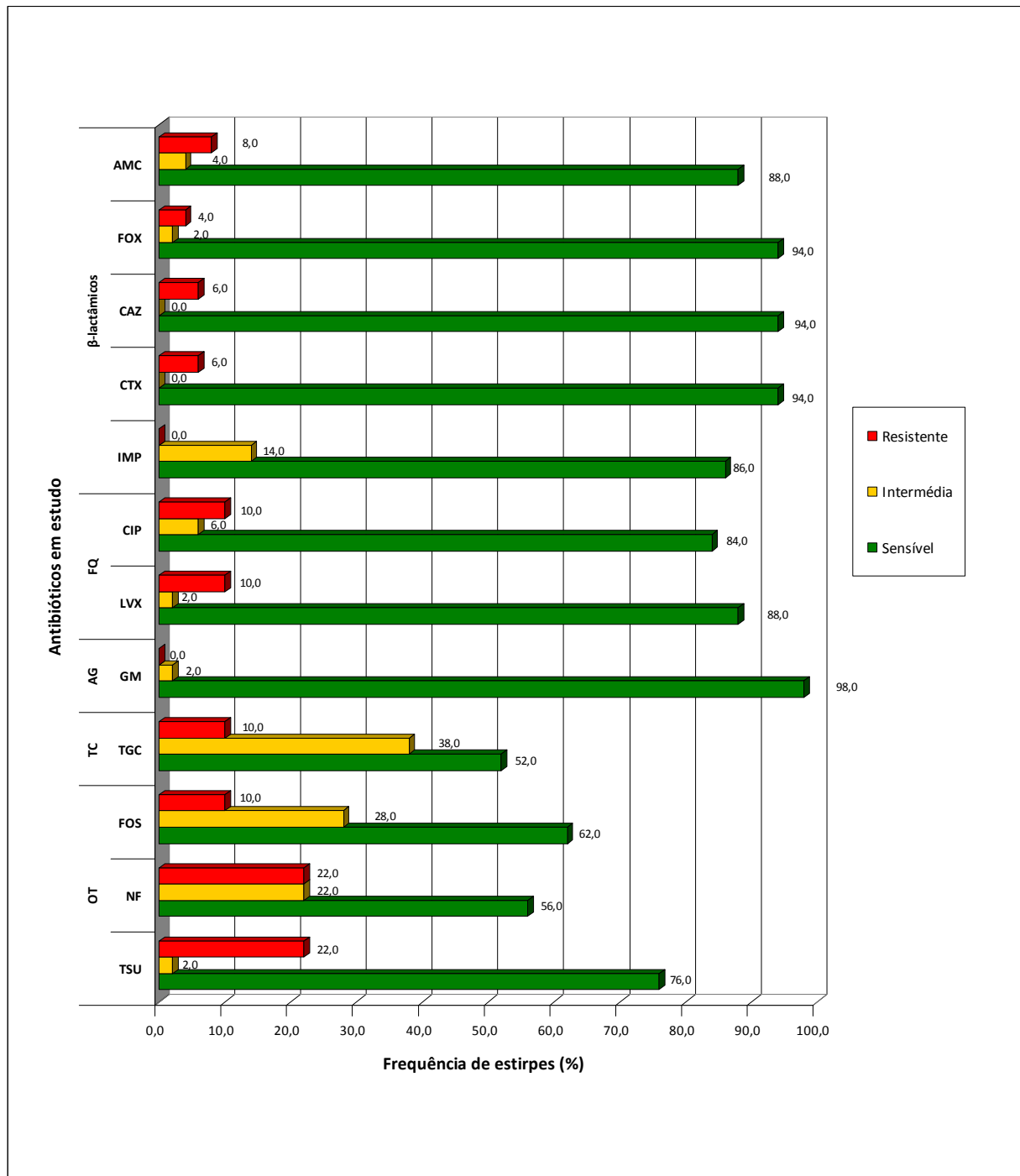
Comparativamente aos estudos a nível hospitalar, são ainda escassos os estudos sobre as ITU adquiridas na comunidade,<sup>233-236</sup> e, particularmente os que consideram a *Klebsiella spp.*<sup>10</sup> A nível nacional, importantes estudos foram efectuados, embora maioritariamente reportem realidades de âmbito regional e incidam particularmente sobre a *E. coli*.<sup>220,221,228-230</sup> Justifica-se desta forma que seja efectuado um estudo multicêntrico que incida particularmente nos isolados de *K. pneumoniae*. Para o efeito, foram seleccionados 50 isolados de *K. pneumoniae* representativos, de forma a efectuar um estudo fenotípico e molecular do perfil de resistência e virulência em situações clínicas de ITU adquiridas na comunidade.

### III.10.2. Caraterização fenotípica: perfil de suscetibilidade

O estudo do perfil de suscetibilidade a doze antibióticos, pertencentes a sete classes, foi realizado para 50 isolados representativas de *K. pneumoniae* e são apresentados na Figura 19. Os resultados obtidos para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos foram: 94,0% de isolados sensíveis às cefalosporinas ceftazidima, cefotaxima e cefoxitina (47/50) e 88,0% (44/50) à amoxicilina-ácido clavulânico, antibiótico para o qual foi identificada uma resistência de 8% (4/50). Para o imipenemo foi identificada uma suscetibilidade de 86,0% (43/50) e suscetibilidade intermédia de 14% (7/50). As fluoroquinolonas ciprofloxacina e levofloxacina apresentaram, respectivamente, frequências de suscetibilidade de 84,0% (42/50) e 88,0% (44/50), suscetibilidade intermédia de 6,0% (3/50) e 2% (1/50) e 10% (5/50) de resistência para ambos os antibióticos. A gentamicina, da classe dos aminoglicosídeos, apresentou um perfil de suscetibilidade de 98,0% (49/50), enquanto a tigeciclina, da classe das tetraciclinas, demonstrou 52,0% (26/50) de suscetibilidade, 38,0% (19/50) de suscetibilidade intermédia e 10,0% (5/50) de resistência. O perfil de suscetibilidade para os antibióticos nitrofurantoína, fosfomicina e trimetoprim/sulfametoxazol foi de,

---

respetivamente, 56,0% (28/50), 62,0% (31/50) e 76,0% (38/50); suscetibilidade intermédia a 22,0% (11/50), 28,0% (14/50) e 2,0% (1/50) e resistência a 22,0% (11/50), 10% (5/50) e 22% (11/50). Desta forma, os antibióticos que apresentaram maior resistência foram a nitrofurantoína e trimetoprim/sulfametoxazol (22,0%) e os antibióticos com maior suscetibilidade foram a gentamicina (98%), seguido da ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina (94%) e amoxicilina-ácido clavulânico e levofloxacina (88%). 12% (6/50) dos isolados são multiresistentes, dado apresentarem resistência a três ou mais classes de antibióticos.



**Figura 19.** Estudo de suscetibilidade aos antibióticos dos 50 isolados de *Klebsiella pneumoniae* isoladas a partir de infecções do trato urinário (ITU) em laboratórios da comunidade.

Legenda: amoxicilina/ácido clavulânico (AMC); cefotaxima (CTX); cefoxitina (FOX), ceftazidima (CAZ), imipenemo (IMP), gentamicina (GM); ciprofloxacina (CIP); levofloxacina (LVX), fosfomicina (FOS), nitrofurantoína (NT), trimetoprim/sulfametoxazol (TSU), fluoroquinolonas (FQ), aminoglicosídeos (AG), tetraciclina (TC), outros (OT)

A terapêutica empírica da ITU deve ser baseada em recomendações internacionais<sup>237</sup> de organismos reconhecidos e, principalmente nas normas de orientação clínica das autoridades nacionais,<sup>238</sup> dado que reflectem o conhecimento da realidade dos agentes etiológicos em Portugal. No entanto, dentro das opções recomendadas, a escolha do antibiótico a administrar deverá ser individualizada e ter em consideração o historial clínico do doente, a existência de alergias, a disponibilidade do antibiótico e o seu custo e, principalmente, a prevalência dos microrganismos a nível local e seu perfil de suscetibilidade.<sup>237</sup> Estes factores, associado ao facto da resistência aos antibióticos ter vindo a aumentar nos últimos anos limita as escolhas terapêuticas,<sup>31, 33</sup> fazendo com que a selecção de uma antibioterapia eficaz seja um processo cada vez mais complexo.

As recomendações internacionais da *Infectious Disease Society of America* (IDSA) desenvolvidas em colaboração com a *European Society for Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) recomendam para o tratamento da cistite não complicada em mulheres a nitrofurantoína, fosfomicina e trimetoprim/sulfametoxazol (cotrimoxazol).<sup>237</sup> Embora este antibiótico tenha sido durante décadas o fármaco preferencial para o tratamento de infeções urinárias agudas,<sup>239</sup> a crescente resistência ao mesmo tem estado na origem que já não seja recomendado nos esquemas terapêuticos iniciados de forma empírica em Portugal.<sup>238</sup> No presente estudo a resistência obtida foi de 22,0% sendo que, de acordo com as recomendações existentes (resistência local >20%),<sup>237</sup> se desaconselha a sua utilização. Actualmente, de acordo com o estabelecido pela Norma N.º 015/2011 da Direcção Geral da Saúde (DGS), a nitrofurantoína, fosfomicina e amoxicilina-ácido clavulânico são considerados os antibióticos de primeira linha para situações de cistite aguda não complicada da mulher não grávida.<sup>238</sup>

A nitrofurantoína é um antibiótico da classe dos nitrofuranos<sup>240</sup> utilizado em situações de infeções urinárias há mais de 50 anos,<sup>241</sup> nomeadamente na profilaxia e tratamento da cistite, não sendo utilizada

no tratamento das infeções urinárias altas.<sup>238</sup> Embora seja frequentemente activo em mais de 90% dos isolados de *E. coli*,<sup>233,242</sup> apresenta menor actividade em isolados de *K. pneumoniae* e *Proteus* spp.<sup>242</sup> No presente estudo verifica-se que 56,0% dos isolados apresentam suscetibilidade a este antibiótico. A emergência de isolados resistentes à nitrofurantoína, mesmo após muitos anos de utilização clínica não era comum.<sup>241</sup> No entanto, em Portugal, a percentagem de isolados resistentes obtida neste estudo (44,0% considerando resistentes e com suscetibilidade intermédia) encontra-se em linha com outro estudo de 2013 que refere 32,8% de resistência em isolados de *K. pneumoniae*, comparativamente a 6,0% de resistência em *E. coli*.<sup>230</sup>

A Fosfomicina é aprovada em numerosos países do mundo, principalmente para o tratamento de infeções do trato urinário não complicadas.<sup>223,224</sup> Uma única dose oral de fosfomicina trometamol atinge concentrações elevadas na urina, com resultados que indicam uma eficácia clínica e bacteriológica semelhante ao de regimes de 7 dias de nitrofurantoína, cotrimoxazol ou ciprofloxacina,<sup>93</sup> sendo actualmente uma importante opção para o tratamento de primeira linha em ITU não complicada.<sup>237</sup> A suscetibilidade à fosfomicina tem-se mantido relativamente estável ao longo do tempo,<sup>93</sup> existindo estudos que reportam uma elevada actividade deste antibiótico, com suscetibilidade  $\geq 90\%$ , para os isolados de *E. coli*,<sup>243</sup> incluindo produtores de ESBL.<sup>233,243</sup> No entanto, outros estudos em isolados que não a *E. coli* são recomendados, dadas as diferenças reportadas no perfil de suscetibilidade.<sup>97</sup> Em Espanha, Rodríguez Lopez *et al.* descrevem isolados uropatogénicos de *K. pneumoniae* da comunidade uma evolução de 93% de suscetibilidade em 1997 para 71% em 2003.<sup>244</sup> Em 2010, um estudo de revisão reporta uma boa atividade *in vitro* (suscetibilidade  $>80\%$ ) em isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL.<sup>95</sup> No entanto, em 2013 foram já reportadas taxas de resistência em isolados de *Klebsiella* spp. (10,8%) superiores às de *E. coli* (2,2%), desaconselhando-se a utilização de fosfomicina em isolados de *Klebsiella* spp. produtores de ESBL.<sup>97</sup> A mesma conclusão é mencionada por outro autor num estudo



publicado em 2015, no qual a suscetibilidade da fosfomicina a isolados de *Klebsiella* spp. foi de 61,7%.<sup>243</sup> Neste estudo, o perfil de suscetibilidade de *K. pneumoniae* à fosfomicina foi de 62%, tendo sido identificadas 28% dos isolados com suscetibilidade intermédia e 10% dos isolados resistentes. De forma preocupante, os resultados obtidos em Portugal para a suscetibilidade à fosfomicina em infeções do trato urinário da comunidade, encontram-se em conformidade com a literatura mais recente, embora em isolados provenientes de infeções adquiridas em ambiente hospitalar.<sup>97,243</sup>

A maior parte do consumo de antimicrobianos por seres humanos tem lugar na comunidade.<sup>44</sup> De acordo com o projecto europeu ESAC - *European Surveillance of Antimicrobial Consumption*, entre 2008 e 2012, o consumo de outros antibióticos (grupo ATC J01X) na comunidade, aumentou de forma significativa em 12 países, entre os quais Portugal, principalmente devido ao consumo de fosfomicina e nitrofuranos (como a nitrofurantoína). O consumo deste grupo variou entre 0,0006 DDD por 1 000 habitantes por dia (Bulgária) até 3,3 DDD por 1 000 habitantes por dia (Noruega). Em Portugal, o valor obtido (1,4 DDD por 1 000 habitantes por dia) foi superior ao valor médio europeu (0,7 DDD por 1 000 habitantes por dia), verificando-se uma tendência crescente significativa,<sup>84</sup> facto que poderá justificar os resultados obtidos no presente estudo.

Embora as recomendações clínicas sejam efectuadas tendo como base o perfil de suscetibilidade da *E. coli*,<sup>237</sup> e que, em 2011, as propostas de antibioterapia empírica apresentadas para tratamento dos episódios de cistite aguda estivessem associadas a taxas de erradicação microbiológica iguais ou superiores a 90%,<sup>238</sup> os resultados indicam que, em Portugal, particularmente nas regiões com elevada prevalência de *K. pneumoniae* deverá ter-se especial atenção à prescrição empírica de nitrofurantoína e fosfomicina, antibióticos para os quais menos de 65% dos isolados de *K. pneumoniae* apresentam suscetibilidade, por forma a evitar falência terapêutica e infeções recidivantes.

Quanto à amoxicilina-ácido clavulânico, a sua prescrição deve ser cautelosa dado que a resistência a este antimicrobiano tem vindo a aumentar nos últimos anos. Embora a suscetibilidade seja de 88,0% verifica-se uma frequência de isolados não susceptíveis de 12,0% (8,0% resistentes e 4,0% com suscetibilidade intermédia), 94% (ceftazidima e cefotaxima). A resistência a estes antibióticos foi sempre inferior a 10%, nomeadamente com índices de resistência de 6% para as cefalosporinas de terceira geração ceftazidima e cefotaxima.

A frequente utilização de profilaxia antibiótica cirúrgica durante tempo excessivo, o elevado consumo hospitalar de carbapenemes, o elevado consumo de quinolonas na comunidade e a exagerada duração da terapêutica antibiótica, são distorções de prescrição antibiótica que necessitam ser corrigidas.<sup>40</sup> De acordo com a publicação da Norma de Duração da Terapêutica Antibiótica, em Julho 2013, que define que, como regra geral, as infeções bacterianas devem ser tratadas com cursos de terapêutica antibiótica não superiores a 7 dias, identificando as situações em que está indicada terapêutica antibiótica com duração superior.<sup>40</sup>

Como alternativa à fosfomicina e nitrofurantoína, as *guidelines* da *Infectious Diseases Society of America* (ISDA) mencionam as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) e  $\beta$ -lactâmicos (amoxicilina-ácido clavulânico e cefalosporinas) para situações clínicas de cistite.<sup>237</sup> Embora sejam uma alternativa, desaconselham o uso empírico de fluoroquinolonas em áreas em que a resistência exceda 10%.<sup>237</sup> A frequência de isolados não susceptíveis de 16,0% para a ciprofloxacina e de 12,0% para a levofloxacina colocam em causa a utilização destes antibióticos no tratamento de infeções urinárias na comunidade em Portugal.

O aumento da resistência as fluoroquinolonas está associado a uma resistência cruzada a outras classes

de antibióticos, nomeadamente  $\beta$ -lactâmicos e a associação trimetoprim/sulfametoxazole. Segundo o *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*, a Europa possui taxas de *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas entre 6% na Islândia e 52% na Turquia (Portugal com 29%). No entanto, o estudo ECO-SENS, que se refere a *E. coli* responsável por infeções urinárias não complicadas, reporta taxas de resistência que variam entre 0 e 14,7% (Portugal com 5,8%). Tendo em conta que *E. coli* é o principal agente responsável por infeções do trato urinário, quer na comunidade, quer no hospital, e que neste trabalho, a resistência à ciprofloxacina aproximou-se dos 20%, é reforçada a necessidade de reavaliação do uso de fluoroquinolonas no tratamento da ITU.

A Tigeciclina já foi identificada como opção terapêutica para enterobactérias produtoras de ESBL,<sup>241</sup> existindo casos esporádicos de aplicabilidade clínica em situações de ITU por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, em Espanha.<sup>245</sup> Nas situações mais complexas que requerem hospitalização, a antibioterapia recomendada é fluoroquinolona, aminoglicosídeo, cefalosporina ou penicilina de espectro alargado em associação com aminoglicosídeo ou, finalmente, a utilização de carbapenemos.<sup>237</sup> As infeções associadas aos cuidados de saúde, em especial as adquiridas em meio hospitalar, são geralmente consideradas infeções complicadas dada a elevada probabilidade de bacterémia e falência terapêutica quando comparados com o ambiente da comunidade. A resistência antimicrobiana do agente causador da infeção é, para além do internamento hospitalar do hospedeiro, um importante factor preditivo da ineficiência terapêutica dos antibióticos.<sup>226</sup>

Associadas a significativas taxas de morbilidade e mortalidade, particularmente quando adquirida no hospital (ITU-AH),<sup>89</sup> verifica-se um crescente isolamento de microrganismos resistentes e produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBL) nas ITU adquiridas na comunidade (ITU-AC).<sup>246</sup> Dados da vigilância epidemiológica a nível local e regional devem ser utilizados para orientar as escolhas empíricas

de terapêutica antimicrobiana efectuada pelos clínicos, permitindo evitar discrepâncias entre o tratamento empírico e os agentes patogénicos causadores de infecção.<sup>247</sup> Diretrizes e normativas de âmbito nacional desempenham também um importante papel na administração de antibióticos ao racionalizar o uso de agentes antimicrobianos de amplo espectro e subsequentes efeitos adversos ecológicos da terapêutica antimicrobiana, como a seleção de organismos resistentes,<sup>248</sup> devendo ser atualizadas regularmente devido à evolução da epidemiologia e à alteração da suscetibilidade bacteriana. Adicionalmente, para tratamento empírico, não deverão ser recomendados antimicrobianos de último recurso como os carbapenemos, por forma a reservar a sua eficácia, bem como a evitar a emergência de estirpes resistentes.<sup>226</sup>

No comportamento dos isolados com os antibióticos do grupo das quinolonas, identificámos índices de suscetibilidade de 84% para a fluoroquinolona de segunda geração ciprofloxacina e 88% para a de terceira geração levofloxacina. Ambos os antibióticos apresentaram 10% de isolados com perfil de resistência. Segundo dados da Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. (INFARMED), as quinolonas representam 12,6% do consumo de total de antibióticos em ambulatório em Portugal, sendo que as mais utilizadas são a ciprofloxacina e a levofloxacina.<sup>249</sup> Os distritos com menor consumo global de antimicrobianos em ambulatório são Castelo Branco, Beja, Faro, Setúbal, Braga e Guarda, sendo Beja, Braga, Viseu e Porto os distritos com menor consumo de quinolonas. De forma oposta, Lisboa, Coimbra, Leiria, Porto, Portalegre e Aveiro têm o mais elevado consumo de antimicrobianos em ambulatório e Portalegre, Évora, Viana do Castelo e Santarém o mais elevado consumo de quinolonas em ambulatório.<sup>40</sup>

O consumo de antibacterianos de uso sistémico, classificados no grupo J01 pelo sistema *Anatomical Therapeutic Chemical Code* (ATC) adoptado pela Organização Mundial de Saúde (OMS),<sup>250</sup> foi reportado em 2011 por 29 países. O consumo variou entre 11,4 doses diárias definidas (DDD) por 1000 habitantes nos Países Baixos e 35,1 DDD por 1 000 habitantes na Grécia, sendo o consumo médio de 19,5 DDD por 1000 habitantes. De forma geral, os antibacterianos mais utilizados foram as combinações de penicilinas, incluindo inibidores da  $\beta$ -lactamase e penicilinas de elevado espectro de actividade.<sup>44</sup> Segundo o ESAC, Portugal ocupa o 9º lugar entre os países com maior consumo de antimicrobianos na Europa em regime de ambulatório. Quinolonas 2,47 DHD média europeia é 1,81<sup>84</sup> DDD por 1000 hab por dia (DHD)

O rácio entre consumo de antibacterianos de espectro largo e consumo de antibacterianos de espectro estreito foi crescente entre 2003 e 2012. No ano passado, foi possível reduzir esta taxa de 37,65% para 34,02%, - 2003 (13,25), 2012 (37,65) e 2013 (34,02)<sup>40</sup> Há uma tendência ligeiramente decrescente do consumo de antibacterianos em ambulatório desde 2005, conforme expresso nos dados do INFARMED; O rácio entre consumo na comunidade de antibióticos de espectro largo sobre antibióticos de espectro estreito, que foi crescente entre 2003 e 2012, diminuiu em 2013 em cerca de 10% e o consumo de quinolonas na comunidade tem apresentado tendência decrescente desde 2007, conforme expresso nos dados do INFARMED; 17. O consumo hospitalar global de antibióticos diminuiu de 2012 para 2013 e o consumo de carbapenemes, sendo ainda extremamente elevado, apresentou sinais de redução no primeiro semestre de 2014, quando comparado com semestres homólogos dos dois anos anteriores<sup>40</sup>

Em Portugal, comparativamente com os outros países europeus, há uma elevada prescrição de quinolonas em ambulatório,<sup>40</sup> a que se associa elevada taxa de resistências a esta classe de antibióticos, o que poderá justificar os resultados apresentados na presente tese. Embora se tenha identificado uma redução progressiva de cerca de 15% entre 2007 e 2013 (2,55 DHD em 2007 e 2,18 DHD em 2013), o

---

consumo de quinolonas em Portugal é ainda superior a outros países europeus (2,47 DHD em 2012, com valores compreendidos entre 0,42 DHD no Reino Unido e 3,48 DHD em Itália), de acordo com o Relatório *“Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012,”* publicado em 2014.<sup>84</sup>

### III.10.3. Determinantes genéticos de resistência: produção de $\beta$ -lactamases

A infecção do trato urinário (ITU) é uma das patologias infecciosas mais comuns a nível da comunidade. No entanto, à semelhança do que se verifica com estudos da etiologia da ITU e do perfil de suscetibilidade dos isolados, também os estudos da frequência de isolados produtores de  $\beta$ -lactamases incidem ainda maioritariamente em isolados isolados em ambiente hospitalar.<sup>20,251</sup> No presente trabalho, foram incluídas 50 isolados uropatogénicas de *K. pneumoniae*. Foram pesquisados e sequenciados os genes que codificam para as  $\beta$ -lactamases: *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>DHA</sub>, sendo os resultados apresentados na Tabela 19.

**Tabela 19.**  $\beta$ -lactamases identificadas em isolados de *K. pneumoniae* isoladas na comunidade (n=50), sexo e idade do hospedeiro e localização geográfica laboratório de isolamento.

| Identificação da estirpe | Hospedeiro<br>Sexo | Idade | Localização do<br>Laboratório | Mecanismo de resistência<br>$\beta$ -lactamase identificada | Nº de estirpes (%)<br>n= 50 (100,0%) |
|--------------------------|--------------------|-------|-------------------------------|---|--------------------------------------|
| 210-010                  | F                  | 79    | Setúbal                       | TEM-156   | 1 (2,0)                              |
| 201-094                  | F                  | 76    | Setúbal                       | TEM-156   | 1 (2,0)                              |
| 201-076                  | M                  | 74    | Setúbal                       | TEM-24  | 1 (2,0)                              |
| 201-075                  | F                  | 46    | Setúbal                       | SHV-11  | 1 (2,0)                              |
| 208-309                  | F                  | 42    | Évora                         | SHV-33  | 1 (2,0)                              |
| 212-193                  | F                  | 90    | Caldas da Rainha              | CTX-M-15, TEM-1   | 1 (2,0)                              |
| <b>TOTAL</b>             |                    |       |                               |   | <b>6 (12,0)</b>                      |

Na amostra em estudo, foram identificadas seis  $\beta$ -lactamases (12%, 6/50), nomeadamente 6% do tipo TEM (3/50), 4% do tipo SHV (2/50) e 2% do tipo CTX (1/50). Após sequenciação, verificou-se tratarem-se das  $\beta$ -lactamases TEM-156 (n=2), TEM-24 (n=1), SHV-11 (n=1), SHV-33 (n=1) e CTX-M-15 (n=1).

A idade média do hospedeiro é de 68 anos, com idades compreendidas entre 42 e 90 anos, nos quais foram identificadas as Kp produtores de SHV-33 e CTX-M-15, respectivamente. Os isolados produtores

de  $\beta$ -lactamases foram identificadas nos Laboratórios de Setúbal (67%, 4/6), Évora (17%, 1/6) e Caldas da Rainha (17%, 1/6).

Foi identificada uma prevalência de 12% (6/50) na produção de  $\beta$ -lactamases por isolados da comunidade, nomeadamente três isolados produtores de TEM-156 e -24 (6%), dois isolados produtores de SHV-11 e 33 (4%) e um isolado produtor de CTX-M-15 (2%). Não se verificou a amplificação do gene que codifica para a produção das enzimas DHA, uma cefalosporinase plasmídica indutível do tipo AmpC. No presente trabalho esta enzima foi pesquisada dada a identificação de perfis fenotípicos compatíveis com esta produção, nomeadamente a resistência à cefoxitina e às combinações de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos com inibidores de  $\beta$ -lactamases, como a amoxicilina/ácido clavulânico.<sup>252</sup> A importância clínica da detecção de  $\beta$ -lactamases AmpC prende-se porque têm sido associadas a uma falsa susceptibilidade a cefalosporinas<sup>253</sup> adicionalmente ao facto de testes fenotípicos poderem não detectar estas enzimas quando são produzidas outras  $\beta$ -lactamases.<sup>254</sup> e de ter sido descrita uma elevada prevalência de resistência aos carbapenemos em isolados AmpC positivos, o que poderá indicar uma proximidade genética com as carbapenemases.<sup>255</sup>

Assim, os resultados evidenciados no presente trabalho devem contribuir para promover acções de intervenção multidisciplinar para controlo de infecção por isolados produtores de  $\beta$ -lactamases AmpC e ESBL,<sup>256</sup> que incluam a identificação dos factores de risco em ITU na comunidade, como a existência de tubos nasogástricos e hospitalização nos três meses prévios,<sup>257</sup> dado que a sua sobrevivência no ambiente pode potenciar a persistência no hospedeiro.

MacVane, S. H *et al.* (2014) num estudo efectuado nos Estados Unidos da América reportam uma incidência de 3,6% em situações de ITU por *E. coli* e *Klebsiella* spp. produtores de ESBL.<sup>251</sup> Por sua vez, Horner, C. S *et al.* efectuaram um estudo de larga escala numa área metropolitana do Reino Unido com



isolados provenientes de urinas da comunidade nas quais foram identificados isolados *E. coli*, *Klebsiella* spp., *P. mirabilis* e outra espécie, no qual a ocorrência de ESBL foi de 6%.<sup>10</sup> Note-se, portanto, que o valor identificado no presente estudo (12%) é bastante superior ao reportado noutros países, indicador da monitorização necessária fora do ambiente hospitalar.

As enzimas do tipo SHV-type foram identificadas em indivíduos com idade inferior a 50 anos e as enzimas do tipo TEM-type e CTX-M-15 foram encontradas em indivíduos com idade superior a 70 anos. Para além dos lares e outras instituições sociais a nível da comunidade, as instalações de saúde que prestam serviço de cuidados de saúde a longo prazo, como Unidades de Cuidados Continuados Integrados (UCCI) podem funcionar como um importante reservatório de microrganismos multirresistentes.<sup>9</sup> No entanto, existem poucos dados que permitam conhecer a verdadeira realidade nacional. A formação e integração das equipas multidisciplinares nesta temática, assim como o estudo dos factores de risco para a colonização, como a existência de feridas, uso recente de fluoroquinolonas e  $\beta$ -lactâmicos ou utilização de corticosteróides,<sup>258</sup> permite uma gestão orientada dos residentes de alto risco no controlo da disseminação de infeções associadas aos cuidados de saúde. As ITU causadas por isolados produtores de ESBL encontram-se associadas a custos de saúde cerca de 1,5 vezes superiores<sup>251</sup> e significativo impacto clínico na terapêutica oral disponível.<sup>259</sup>

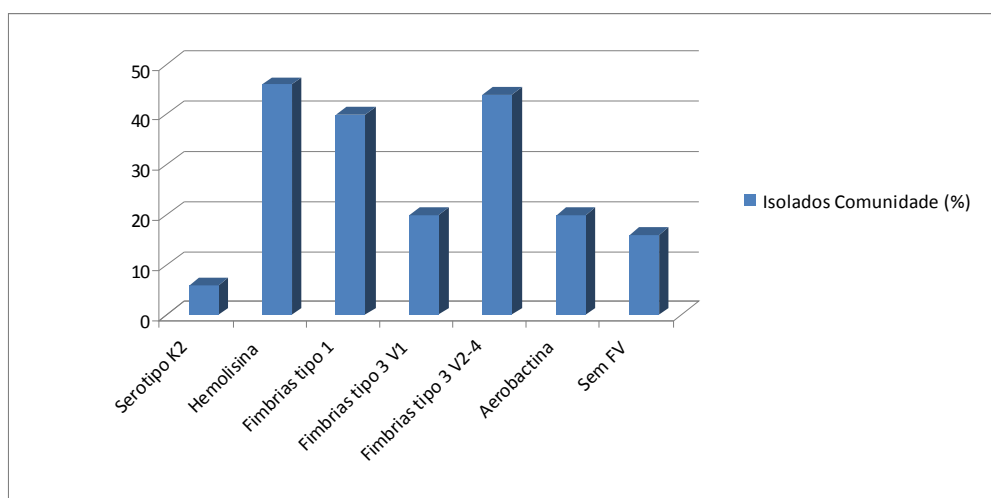
É usualmente definido que as infeções causadas por isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL se encontram usualmente confinadas ao ambiente hospitalar, contrariamente aos isolados de *E. coli* produtores de ESBL, dos quais já cerca de metade das infeções são associadas a doentes não hospitalizados.<sup>260</sup> No entanto, o crescente aumento de casos de infeção adquirida na comunidade causada por estes microrganismos sugere que a identificação precoce de doentes de elevado risco para a aquisição de isolados produtores de ESBL, baseada na sua origem geográfica e o estudo do percurso de

---

viajante, poderá ajudar a otimizar estratégias. No presente estudo reporta-se uma dispersão geográfica dos isolados identificados: produtores de TEM-156, -24 e SHV-11 identificados no Laboratório de Setúbal, o isolado produtor de SHV-33 foi identificado em Évora e o isolado produtor de CTX-M-15 foi identificado no Laboratório das Caldas da Rainha. Os resultados indiciam a necessidade de implementar uma rigorosa monitorização aos isolados de ITU da comunidade, de forma a acompanhar os níveis de resistência, entender o impacto das decisões de prescrição empíricas atuais sobre a evolução dos resultados e, principalmente acompanhar a evolução da ocorrência de isolados produtores de  $\beta$ -lactamases.

### III.10.4. Determinantes genéticos de virulência

A emergência e disseminação de isolados de *K. pneumoniae*, resistentes aos principais antibióticos usados como opção terapêutica, realçam a importância de estudar os mecanismos pelos quais esta bactéria interage com o hospedeiro. Pretende-se, assim, efectuar a caracterização dos 50 isolados no que infere aos determinantes genéticos de virulência. Desta forma, foram pesquisados os genes que codificam para o serotipo K2, aerobactina, hemolisina e adesinas - fímbrias do tipo 1 e 3. Os resultados são apresentados na Figura 20.



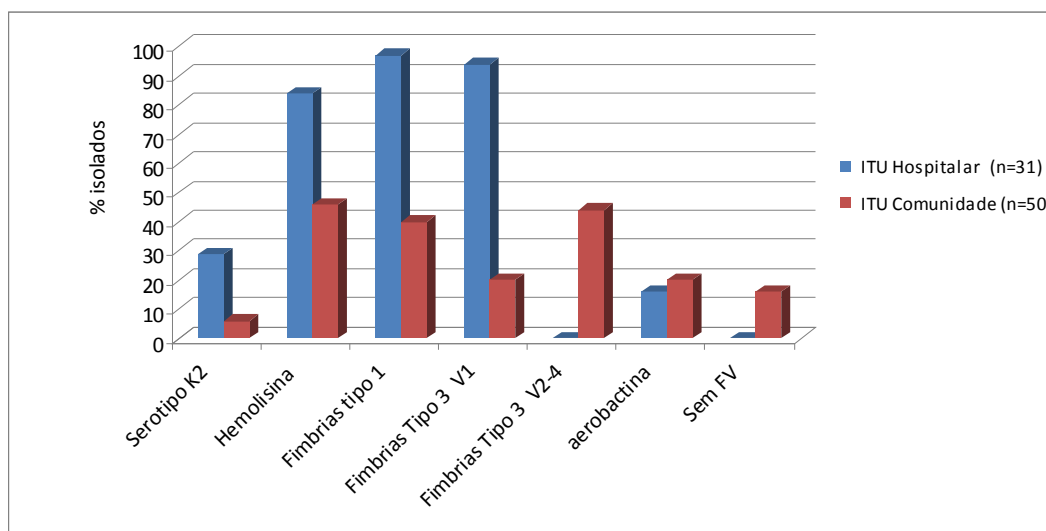
Legenda: FV – factores de virulência

**Figura 20.** Perfil de virulência dos isolados de *K. pneumoniae* da comunidade

Compreender a patogénese da infecção urinária da comunidade através do estudo de isolados de *K. pneumoniae* é de considerável importância. Pela análise dos resultados verifica-se que os factores de virulência mais frequentemente identificados nos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de ITU da comunidade são a hemolisina (23/50, 46%) e as adesinas fimbriais do tipo 3 - Variante 2-4 (22/50, 44%) e do tipo 1 (20/50, 40%). A adesina fimbrial do tipo 3 – variante 1 foi identificada em 20% dos isolados

(10/50). Também a aerobactina iucC foi identificada em 20% dos isolados (10/50). Apenas 3 isolados são do serótipo capsular K2 (3/50, 6%). 16% dos isolados (8/50) não apresentavam qualquer dos factores de virulência pesquisado no presente trabalho.

Com o principal objectivo de caracterizar o perfil e padrão de virulência de isolados com distintos perfis de resistência, foram seleccionados isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de infeções do trato urinário cuja identificação ocorreu em ambiente hospitalar (n=31) e comparados com os isolados da comunidade (n=50). Os resultados são apresentados na Figura 21.



**Figura 21.** Perfil de virulência de isolados *K. pneumoniae* provenientes de infeções trato urinário (ITU) hospitalares e da comunidade

Com a análise dos resultados é possível verificar que os isolados isoladas em situações de infeções do trato urinário em ambiente hospitalar, comparativamente às isolados isoladas em ambiente da comunidade, apresentam mais frequentemente os genes que codificam para os factores de virulência hemolisina (84% Vs 46%,  $p=0,0009$  IC95%), fímbrias do tipo 1 (97% Vs 40%,  $p<0,0001$  IC95%), fímbrias do

tipo 3 – variante 1 (94% Vs 20%,  $p < 0,0001$  IC95%) e serótipo K2 (29% Vs 6%,  $p = 0,0081$  IC95%). Por sua vez, as fímbrias do tipo 3 – variante 2-4 foram mais frequentemente identificadas em *K. pneumoniae* isoladas na comunidade (44% Vs 0%,  $p < 0,0001$  IC95%). Não se verificou diferença significativa no que infere à identificação do gene codificante da aerobactina (16% Vs 20%,  $p = 0,7735$  IC95%). Em 16% (8/50) dos isolados isoladas na comunidade não foi identificado nenhum dos genes pesquisados, situação que não se verificou nos isolados hospitalares.

Não obstante a identificação de uma superior frequência nos isolados hospitalares, confirma-se que a hemolisina (com actividade hemolítica para os glóbulos vermelhos humanos), as adesinas do tipo 1 (as quais medeiam a aderência das estruturas das células do hospedeiro que contêm manose) e do tipo 3 (associadas à aderência na ausência de manose e à formação de biofilmes) são importantes factores de virulência em situações clínicas de infeções urinárias hospitalares e adquiridas na comunidade.

As fímbrias ou adesinas do Tipo 3 são organelos adesivos encontrados em enterobactérias. As fímbrias promovem a formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas embora a identidade exacta do receptor para o tipo 3 fímbrias adesina, MrkD, permaneça indefinida.<sup>178</sup> Sanchez, C. J., Jr. *et al.* descrevem que a formação de biofilme é um factor de virulência com relevância que contribui para a cronicidade da infecção e que os isolados com infeções persistentes são mais frequentemente formadores de biofilme.<sup>261</sup> Como já mencionado anteriormente, existe uma variabilidade estrutural e funcional da adesina MrkD, que tem influência directa na força de aderência e capacidade de formação de biofilme.<sup>178</sup>

Recorde-se que, nos isolados hospitalares com múltiplas origens, a variante 2-4 desta adesina, aparentemente associada a uma superior força adesiva, foi identificada em 75% dos isolados ambientais (superfícies), em 13% dos isolados provenientes dos estudos de colonização e em 12% dos isolados

---

clínicos de exsudados purulentos. No presente Estudo, no qual se estudam também os isolados de infecções urinárias adquiridas na comunidade verifica-se uma identificação em 44% dos isolados. No presente trabalho, a variante 2-4 desta adesina encontra-se associada o isolados menos resistentes e embora possa não se tratar de um factor de virulência essencial para os isolados hospitalares, os resultados obtidos são indicativos de significativa importância em isolados ambientais como superfícies, isolados de ITU adquiridos na comunidade, colonização e exsudados purulentos. Struve, C. *et al.* estudaram modelos de infecção do trato urinário, reportando a potencial importância das fímbrias do Tipo 3 em infecções de *K. pneumoniae* não complicadas.<sup>262</sup>

De forma a verificar a possível existência de um padrão de virulência característico nos isolados da comunidade e nos isolados hospitalares, foram comparados os resultados obtidos com os genes de virulência identificados por isolado. Os resultados são apresentados na Tabela 20.

**Tabela 20.** Perfil de virulência dos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de ITU da Comunidade e Hospitalar.

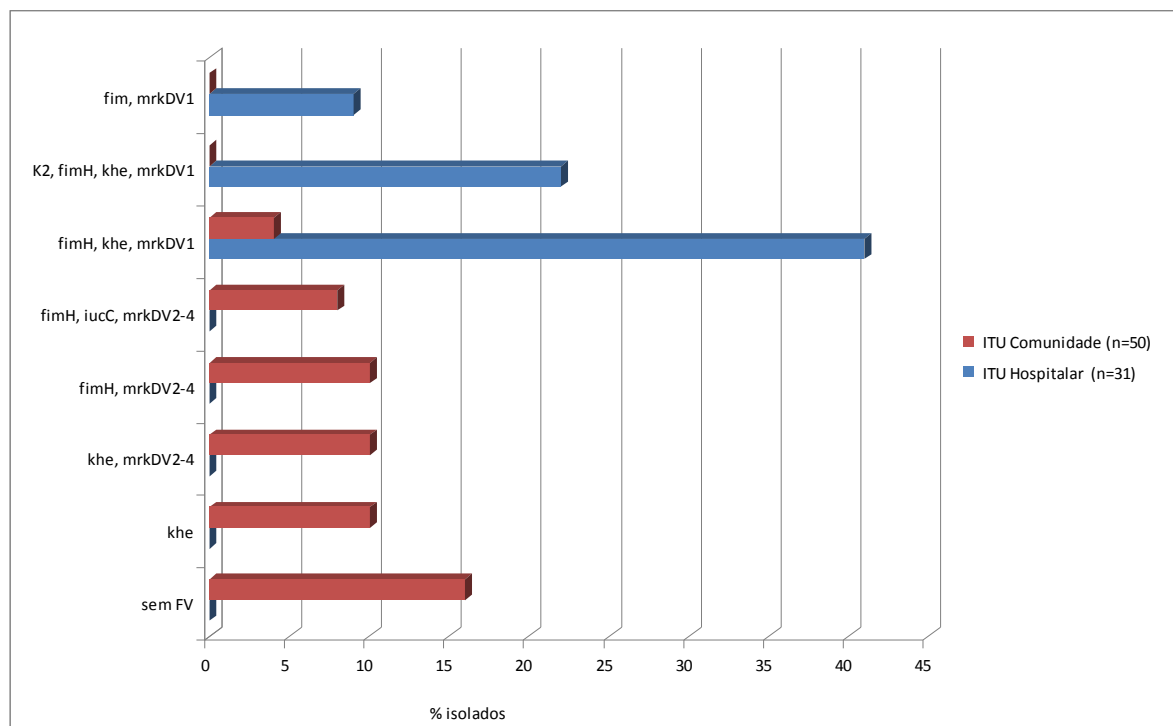
| Nº Factores de virulência (FV) | Factores de virulência identificados          | nº isolados (%)                 |                                 |
|--------------------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|
|                                |   | ITU Comunidade<br>n=50 (100,0%) | ITU Hospitalar<br>n=32 (100,0%) |
| 0 FV                           | Sem FV  | 8 (16,0)                        | 0                               |
| 1 FV                           | <i>khe</i>                                    | 5 (10,0)                        | 0                               |
|                                | <i>fimH</i>                                   | 1 (2,0)                         | 0                               |
|                                | <i>mrkD<sub>V1</sub></i>                      | 2 (4,0)                         | 0                               |
|                                | <i>mrkD<sub>V2-4</sub></i>                    | 3 (6,0)                         | 0                               |
| 2 FV                           | <i>fimH, khe</i>                              | 2 (4,0)                         | 2 (6,3)                         |
|                                | <i>fimH, mrkD<sub>V1</sub></i>                | 0                               | 3 (9,4)                         |
|                                | <i>khe, iucC</i>                              | 1 (2,0)                         | 0                               |
|                                | <i>iucC, mrkD<sub>V2-4</sub></i>              | 2 (4,0)                         | 0                               |
|                                | <i>khe, mrkD<sub>V1</sub></i>                 | 2 (4,0)                         | 0                               |
|                                | <i>khe, mrkD<sub>V2-4</sub></i>               | 5 (10)                          | 0                               |
|                                | <i>fimH, mrkD<sub>V2-4</sub></i>              | 5 (10)                          | 0                               |
|                                | <i>fimH, khe, mrkDV1</i>                      | 2 (4,0)                         | 13 (40,6)                       |
|                                | <i>fimH, khe, iucC</i>                        | 1 (2,0)                         | 0                               |
|                                | <i>fimH, khe, mrkD<sub>V2-4</sub></i>         | 2 (4,0)                         | 0                               |
|                                |   |                                 |                                 |
| 3 FV                           | <i>fimH, iucC, mrkD<sub>V1</sub></i>          | 2 (4,0)                         | 1 (3,1)                         |
|                                | <i>fimH, iucC, mrkD<sub>V2-4</sub></i>        | 4 (8,0)                         | 0                               |
|                                | <i>khe, mrkDV1, iucC</i>                      | 0                               | 1 (3,1)                         |
|                                | <i>K2, khe, mrkD<sub>V1</sub></i>             | 2 (4,0)                         | 0                               |
|                                | <i>K2, fimH, mrkD<sub>V1</sub></i>            | 0                               | 2 (6,3)                         |
| 4FV                            | <i>K2, fimH, khe, mrkD<sub>V2-4</sub></i>     | 1 (2,0)                         | 0                               |
|                                | <i>K2, fimH, khe, mrkD<sub>V1</sub></i>       | 0                               | 7 (21,9)                        |
|                                | <i>fimH, khe, mrkD<sub>V1</sub>, iucC</i>     | 0                               | 2 (6,3)                         |
| 5FV                            | <i>K2, fimH, khe, mrkD<sub>V1</sub>, iucC</i> | 0                               | 1 (3,1)                         |

Na Tabela 20 são apresentados os perfis de virulência dos isolados de ITU da comunidade e de origem hospitalar. Os isolados de *K. pneumoniae* da comunidade apresentam 18 perfis de virulência distintos,

sendo que 72% dos isolados (36/50) apresentam perfis de zero, um ou dois factores de virulência no mesmo isolado. 34% dos isolados (17/50) apresentam concomitantemente dois factores de virulência.

Por sua vez, os isolados hospitalares apresentam 9 perfis de virulência distintos. Os resultados indiciam assim uma superior adaptação dos isolados hospitalares, assim como uma superior complexidade genética, dado que 53% (17/32) da amostra hospitalar apresenta três factores de virulência no mesmo isolado hospitalar comparativamente a 26% (13/50) dos isolados da comunidade, assim como 28% (9/32) dos isolados hospitalares apresentam quatro factores de virulência comparativamente a 2% (1/50) nos isolados da comunidade. Os padrões de virulência mais comuns encontram-se representados na Figura 22.

**Figura 22.** Padrões de virulência dos isolados com Infecção do Trato Urinário (ITU) da Comunidade e Hospitalares





De uma análise mais detalhada verifica-se a existência de 7 padrões característicos para cada um dos grupos de isolados: ITU hospitalares e adquiridas na comunidade. O perfil mais comum dos isolados da comunidade é o perfil sem factores de virulência (8/50, 16%) seguido de um factor de virulência perfil *khe* e dos perfis de três genes de virulência *khe, mrkDV2-4* (5/50, 10%); *fimH, mrkDV2-4* (5/50, 10%) e *fimH, iucC e mrkDV2-4* (4/50, 8%). Nos isolados hospitalares, o perfil de virulência mais frequentemente identificado é o *fimH, khe, mrkDV1* (13/32, 41%), o qual também foi identificado em 4% dos isolados da comunidade, seguido do *K2, fimH, khe, mrkDV1* (7/32, 22%) e do *fimH, mrkDV1* (3/32, 9%). De facto, os resultados indicam a existência de vantagem competitiva no padrão *fimH, khe, mrkDV1* em isolados hospitalares com serotipo K2 ou não-K2 comparativamente à total ausência de factores de virulência nos isolados de *K. pneumoniae* da comunidade e aos padrões com os factores de virulência *khe, fimH e mrkDV2-4*. Esta análise mantém-se quando são comparados os perfis de virulência dos isolados produtores de  $\beta$ -lactamases em isolados da comunidade e do hospital (Tabela 21), independentemente do produto biológico no qual ocorreu a identificação.

**Tabela 21.** Perfis de virulência mais frequentes dos isolados de *K. pneumoniae* de acordo com a produção de  $\beta$ -lactamases e do ambiente no qual foram identificados (comunidade e hospital).

|   |                   | número de isolados (n) | Perfis de virulência mais frequentes | Identificação n (%) |
|---|-------------------|------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| <b><math>\beta</math>-lactamases comunidade</b>   | SHV-33            | 1                      | <i>fimH, mrkDV2-4</i>                | 1 (100,0)           |
|   | SHV-11            | 1                      | <i>mrkDV2-4</i>                      | 1 (100,0)           |
|   | TEM-156           | 2                      | <i>mrkDV1</i>                        | 1 (50,0)            |
|   |                   |                        | <i>khe, mrkDV1</i>                   | 1 (50,0)            |
|   | TEM-24            | 1                      | <i>Sem factores de virulência</i>    | 1 (100,0)           |
|   | CTX-M-15          | 1                      | <i>khe</i>                           | 1 (50,0)            |
| <b><math>\beta</math>-lactamases hospitalares</b> | TEM-1 superfícies | 4                      | <i>fimH, khe, mrkDV2-4</i>           | 3 (75,0)            |
|   | TEM-1 colonização | 11                     | <i>fimH, mrkDV1</i>                  | 2 (18,2)            |
|   |                   |                        | <i>fimH, khe, mrkDV1</i>             | 2 (18,2)            |
|   |                   |                        | <i>K2, fimH, khe, mrkDV1</i>         | 2 (18,2)            |
|   |                   |                        | <i>khe, mrkDV1</i>                   | 2 (18,2)            |
|   | TEM-10            | 7                      | <i>fimH, khe, mrkDV1</i>             | 4 (57,1)            |
|   | TEM-24            | 5                      | <i>fimH, khe</i>                     | 3 (60,0)            |
|   | CTX-M-15          | 46                     | <i>fimH, mrkDV1</i>                  | 22 (47,8)           |
|   |                   |                        | <i>fimH, khe, mrkDV1</i>             | 23 (50,0)           |
|   | KPC-3             | 16                     | <i>K2, fimH, mrkDV1</i>              | 6 (37,5)            |
|   | KPC-3, SHV-11     | 4                      | <i>fimH, khe, mrkDV1</i>             | 2 (50,0)            |
|   |                   |                        | <i>K2, fimH, khe, mrkDV1</i>         | 2 (50,0)            |
|   | KPC-3, SHV-35     | 1                      | <i>fimH, mrkDV1</i>                  | 1 (100)             |
|   | KPC-3, CTX-M-15   | 6                      | <i>K2, fimH, khe, mrkDV1</i>         | 2 (33,3)            |

Os isolados da comunidade identificados como produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro restrito apresentaram 6 perfis de virulência distintos, nos quais coexistiam zero, um ou dois genes de virulência no mesmo isolado. O isolado produtor de  $\beta$ -lactamase de espectro restrito SHV-33 foi identificado com o perfil *fimH, mrkDV<sub>2-4</sub>* enquanto o isolado produtor de SHV-11 apresentou o gene *mrkDV<sub>2-4</sub>*. Por sua vez, os dois isolados produtores de TEM-156 apresentaram perfis distintos, nomeadamente *mrkDV1* (n=1) e *khe, mrkDV1* (n=1).

Como pode ser verificado na Tabela 21, os perfis de virulência são distintos entre os isolados provenientes da comunidade e do hospital, ainda que a enzima  $\beta$ -lactamase produzida seja comum. Os

isolados produtores de CTX-M-15 da comunidade apresentam maioritariamente um perfil de virulência contendo um factor de virulência – *khe*, comparativamente aos perfis com dois e três factores de virulência identificados nos isolados hospitalares - *fimH*, *mrkDV1* e *fimH*, *khe*, *mrkDV1*. Também na enzima TEM-24 o perfil de virulência encontrado em isolados da comunidade foi a ausência de factores de virulência comparativamente ao perfil *fimH*, *khe* em isolados hospitalares. Os resultados obtidos corroboram que é o perfil de resistência aos antibióticos que se sobrepõe ao perfil de virulência, não obstante ser da maior importância a análise dos perfis de virulência melhor sucedidos, assim como a crescente complexidade dos isolados mais resistentes.

No que infere à virulência dos isolados da comunidade e sua comparação com isolados hospitalares poderá ser mencionado que:

- A existência de isolados de *K. pneumoniae* da comunidade sem qualquer factor de virulência;
- Inferior frequência de identificação de factores de virulência em isolados de infeções do trato urinário causados por *K. pneumoniae* da comunidade comparativamente aos isolados hospitalares;
- A variabilidade de perfis de virulência existentes nos isolados da comunidade face aos isolados hospitalares, corroborando que o perfil de resistência se sobrepõe ao perfil de virulência.



## IV. CONCLUSÃO



## IV. CONCLUSÃO

A título de conclusão, o presente trabalho evidenciou que:

1. Se verificou um aumento progressivo de resistência desde o isolamento de estirpes produtores da  $\beta$ -lactamase TEM-1/SHV-1 na década de 80 até às KPC-3 em 2009/2010, com o aparecimento de um novo perfil de resistência a, aproximadamente, cada 10 anos.
2. Os índices de resistência superiores a 70% encontrados para aos antibióticos cefalosporinas, gentamicina e ciprofloxacina, aliado à resistência aos carbapenemos por produção de KPC, antevêm um grande desafio terapêutico e alertam para uma necessidade urgente de medidas preventivas e de rigoroso controlo e monitorização destes isolados.
3. O perfil de suscetibilidade da Fosfomicina (>80%) para os isolados produtores de carbapenemases é promissor na utilização deste antibiótico para o tratamento de infeções causadas por estes microrganismos. Por sua vez, os resultados obtidos com a Tigeciclina indiciam a necessidade de monitorização do tratamento de microrganismos Gram negativo com este antibiótico, por forma a minimizar a emergência de estirpes resistentes.
4. Nos isolados hospitalares, identificámos um fenótipo de virulência comum e independente da  $\beta$ -lactamase produzida, com a presença de fímbrias do tipo 1 e tipo 3, associadas à capacidade da aderência e produção de biofilmes, e da hemolisina, associada a quadros severos de infecção. No entanto, nos isolados produtores de carbapenemases KPC-3 o fenótipo de virulência identificado poderá ser utilizado como marcador de patogenicidade dado apresentarem características pouco comuns de

acumulação de genes de virulência, nomeadamente com a identificação dos factores de virulência serotipo capsular K2, mais frequentemente identificado em infeções invasivas severas e do sideróforo aerobactina, que confere vantagem às bactérias de se desenvolverem em condições de baixas concentrações de ferro.

5. O perfil epidemiológico da *K. pneumoniae* produtores da  $\beta$ -lactamase de espectro alargado CTX-M-15, que apresentam predominantemente o clone ST 15 é distinto das estirpes produtores da carbapenemase KPC-3 que apresentam o clone ST 14, substituindo o clone ST 11 identificado nos primeiros isolados produtores de KPC-3 e diferindo do clone mais comum a nível mundial, ST 258.

6. Os isolados de *K. pneumoniae* têm um elevado potencial de disseminação e de virulência, sendo frequentemente responsáveis por surtos hospitalares a nível mundial. O conhecimento dos mecanismos resistência aos antibióticos e a caracterização molecular dos isolados hospitalares aumenta a capacidade dos microbiologistas e epidemiologistas na monitorização da propagação da resistência aos antibióticos entre unidades de saúde e a comunidade.

7. A caracterização dos isolados de *K. pneumoniae* responsáveis por infeções urinárias na comunidade e a comparação dos isolados de infeções da comunidade com os isolados provenientes do meio hospitalar permitiu conhecer a evolução desta espécie bacteriana nos dois ambientes, tendo-se identificado menos factores de virulência e menos resistência aos antibióticos nas bactérias da comunidade, mesmo quando comparados isolados com a produção da mesma  $\beta$ -lactamase, confirmando não ser este um factor predominante para a virulência em isolados não produtores de KPC-3.



O presente estudo tem algumas limitações relacionadas com a ausência de dados de caracterização do hospedeiro, nomeadamente a caracterização sócio-demográfica da amostra hospitalar, dados clínicos relevantes (diagnóstico associado à infecção, antibioterapia prévia e mortalidade), bem como a história clínica (proveniência de outra instituição hospitalar, unidade de cuidados continuados ou lar), informação relevante para efeitos de vigilância epidemiológica. A outra limitação prende-se com a selecção da amostra que, sendo representativa da colecção de isolados multiresistentes existente na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa durante 31 anos, não pode ser utilizada para inferir informação quanto à prevalência de estirpes de *Klebsiella* spp. produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado ou carbapenemases num Centro Hospitalar terciário em Lisboa. No entanto, a presente tese compreende um estudo epidemiológico molecular que foi realizado numa amostra de dimensão estatisticamente representativa face à colecção existente, com uma abordagem rigorosa, sistemática e muito completa. Acresce ainda que o horizonte temporal do estudo é bastante amplo (31 anos), o que permite analisar a evolução da resistência e virulência da mesma espécie, no mesmo ambiente hospitalar. Adicionalmente, foi possível comparar resultados clonais dos isolados produtores de CTX-M-15 com isolados de 4 outras unidades hospitalares da Região de Lisboa, bem como caracterizar isolados identificados em Infecções do Trato Urinário da comunidade e do hospital. Também o estudo de monitorização de isolados resistentes aos carbapenemos permitiu inferir quanto à diversidade de  $\beta$ -lactamases produzidas por géneros da mesma espécie (*K. pneumoniae* em comparação com *K. oxytoca*), bem como por outras espécies como *E. coli*, *E. aerogenes*, *C. freundii* e *A. baumannii*.

Após este trabalho considera-se existir evidência suficiente para afirmar que especial atenção deverá ser dedicada à temática das Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde causadas por *K. pneumoniae* e, em particular, aos isolados de *K. pneumoniae* produtores da carbapenemase KPC-3 pertencente ao clone de alto risco ST 14. A variabilidade molecular identificada, a acumulação e diversidade de genes de

resistência e virulência, bem como a presença de elementos genéticos móveis, em especial nos isolados produtores da carbapenemase KPC-3, indicam um potencial de disseminação horizontal destas estirpes patogénicas intra e inter espécies, que compreende um risco para a Saúde Pública.

A epidemiologia molecular e o conhecimento dos determinantes de resistência e virulência é relevante para uma adequada implementação de medidas de controlo da infecção, de modo a impedir a emergência e a disseminação de estirpes multirresistentes e virulentas, quer no ambiente hospitalar quer na comunidade. A análise da evolução destes isolados indica também o aparecimento de novas  $\beta$ -lactamases mais resistentes e com maior potencial de virulência em ciclos de, aproximadamente, 10 anos. Mudanças na epidemiologia das ESBL impõem novas abordagens terapêuticas e diferenciadas formas de controlo da infecção, com sérias medidas preventivas e um rigoroso controlo e monitorização destes isolados, em ambiente hospitalar e da comunidade.

Esta é uma área de claro interesse para investigação futura dada a limitação actual de opções terapêuticas para as infeções causadas por agentes patogénicos gram-negativo, em especial em infeções causadas por *K. pneumoniae*. Estudos multicêntricos europeus e intercontinentais de monitorização da suscetibilidade antimicrobiana, em especial nos isolados produtores de carbapenemases permitirá esclarecer se o clone de alto risco ST14 identificado em Portugal apresenta noutros países as mesmas características de resistência e virulência identificadas no presente trabalho. Adicionalmente, são requeridos estudos intervencionais que determinem a expressão dos genes de virulência, bem como estudos in vivo que permitam esclarecer o impacto dos marcadores de virulência na mortalidade do hospedeiro.

## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Podschun, R. & Ullmann, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews* **11**, 589-603, (1998).
- 2 Barroso, H., Freitas-Vieira, A. & Duarte, A. Molecular characterization of a ceftazidime-resistant *Morganella morganii* isolate producing a TEM-10 beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**, 434-435, (1999).
- 3 Center for Disease Control and Prevention. National and State Healthcare Associated Infections - Progress Report. (2014).
- 4 Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., Taveira, N. *Microbiologia Médica*. Vol. 1 (Lidel, 2014).
- 5 Sumer, S. *et al.* Two outbreaks of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Int.* **56**, 222-226, (2014).
- 6 Bush, K. *et al.* Comment on: Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **64**, 212-213; author reply 213-215, (2009).
- 7 Giske, C. G. *et al.* Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **63**, 1-4, (2009).
- 8 Lin, W. H. *et al.* Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from community-acquired recurrent urinary tract infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, (2014).
- 9 Lim, C. J. *et al.* Prevalence of multidrug-resistant organisms and risk factors for carriage in long-term care facilities: a nested case-control study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, (2014).
- 10 Horner, C. S., Abberley, N., Denton, M. & Wilcox, M. H. Surveillance of antibiotic susceptibility of

- Enterobacteriaceae* isolated from urine samples collected from community patients in a large metropolitan area, 2010-2012. *Epidemiology and infection* **142**, 399-403, (2014).
- 11 Paterson, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: *enterobacteriaceae*. *The American journal of medicine* **119**, S20-28; discussion S62-70, (2006).
  - 12 Bush, K., Jacoby, G. A. & Medeiros, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**, 1211-1233, (1995).
  - 13 Rodriguez-Bano, J. & Paterson, D. L. A change in the epidemiology of infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **42**, 935-937, (2006).
  - 14 Alobwede I.N., M. Z. F. H., Todd N., Hancox A., Allen M., Heritage J., Hawkey P.M. Changes in the prevalence of genes coding for ESBLs in response to alteration in antibiotic usage over a ten year period. *EMBL*, (2001).
  - 15 Ambler, R. P. & Meadway, R. J. Chemical structure of bacterial penicillinases. *Nature* **222**, 24-26, (1969).
  - 16 Castanheira, M., Farrell, S. E., Krause, K. M., Jones, R. N. & Sader, H. S. Contemporary diversity of beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* in the nine U.S. census regions and ceftazidime-avibactam activity tested against isolates producing the most prevalent beta-lactamase groups. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, 833-838, (2014).
  - 17 Sharma, M., Pathak, S. & Srivastava, P. Prevalence and antibiogram of Extended Spectrum beta-Lactamase (ESBL) producing Gram negative bacilli and further molecular characterization of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* **7**, 2173-2177, (2013).
  - 18 Jones, R. N. *et al.* Resistance surveillance program report for selected European nations (2011).

- Diagnostic microbiology and infectious disease* **78**, 429-436, (2014).
- 19 Caneiras, C. *Bacteriémias: determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de Escherichia coli e Klebsiella spp.*, Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina, (2009).
- 20 Sader, H. S., Flamm, R. K. & Jones, R. N. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteremia isolates in patients with urinary tract infection: results from United States and European hospitals (2009-2011). *Journal of chemotherapy* **26**, 133-138, (2014).
- 21 Ramphal, R. & Ambrose, P. G. Extended-spectrum beta-lactamases and clinical outcomes: current data. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **42 Suppl 4**, S164-172, (2006).
- 22 Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews* **18**, 657-686, (2005).
- 23 Falagas, M. E. & Karageorgopoulos, D. E. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *The Journal of hospital infection* **73**, 345-354, (2009).
- 24 Poirel, L., Heritier, C., Tolun, V. & Nordmann, P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**, 15-22, (2004).
- 25 Mendes, R. E. *et al.* First isolation of bla(VIM-2) in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**, 1433-1434, (2004).
- 26 Toleman, M. A., Biedenbach, D., Bennett, D. M., Jones, R. N. & Walsh, T. R. Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **55**, 61-70, (2005).
- 27 Samuelsen, O. *et al.* Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of*

- the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **17**, 1811-1816, (2011).
- 28 Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L. & Nordmann, P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clinical microbiology reviews* **18**, 306-325, (2005).
- 29 Oteo, J. *et al.* Carbapenemase-producing *enterobacteriaceae* in Spain in 2012. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 6344-6347, (2013).
- 30 Dautzenberg, M. J. *et al.* Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae* in the Netherlands, 2009 to 2011. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **19**, (2014).
- 31 Power, K. *et al.* Molecular Analysis of OXA-48-Carrying Conjugative IncL/M-Like Plasmids in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Ireland. *Microbial drug resistance*, (2014).
- 32 Strategies for global surveillance of antimicrobial resistance: Report of a technical consultation. (World Health Organization, Geneva, 2013).
- 33 Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. (European Centre for Disease Prevention and Control ECDC, Stockholm, 2013).
- 34 Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance. (World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2014).
- 35 Rice, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESCAPE. *The Journal of infectious diseases* **197**, 1079-1081, (2008).
- 36 Peterson, L. R. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE revisited. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **49**, 992-993, (2009).
- 37 Boucher, H. W. *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **48**, 1-12, (2009).
- 38 Pendleton, J. N., Gorman, S. P. & Gilmore, B. F. Clinical relevance of the ESCAPE pathogens.



- 
- Expert Rev Anti Infect Ther* **11**, 297-308, (2013).
- 39 State of the World's Antibiotics. (Center for Disease Dynamics, Economics & Policy Washington, D.C, 2015).
- 40 Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em números – 2014. (Direção-Geral da Saúde, Lisboa, 2014).
- 41 Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. (European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 2014).
- 42 Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. (European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 2015).
- 43 Cuzon, G. *et al.* Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerging infectious diseases* **16**, 1349-1356, (2010).
- 44 Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2011. (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC, Stockholm, 2014).
- 45 Horan, T. C., Andrus, M. & Dudeck, M. A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *American journal of infection control* **36**, 309-332, (2008).
- 46 Beceiro, A., Tomas, M. & Bou, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clinical microbiology reviews* **26**, 185-230, (2013).
- 47 Carattoli, A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International journal of medical microbiology : IJMM* **301**, 654-658, (2011).
- 48 Carattoli, A. *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of microbiological methods* **63**, 219-228, (2005).
- 49 Carattoli, A. *et al.* Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerging infectious diseases* **12**, 1145-1148, (2006).
-

- 
- 50 Carattoli, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**, 2227-2238, (2009).
- 51 Carattoli, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary research* **32**, 243-259, (2001).
- 52 de Cassia Andrade Melo, R. *et al.* Presence of fimH, mrkD, and irp2 Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE, Brazil. *Current microbiology*, (2014).
- 53 Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B. & Darfeuille-Michaud, A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in microbiology* **154**, 9-16, (2003).
- 54 Schroll, C., Barken, K. B., Krogfelt, K. A. & Struve, C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC microbiology* **10**, 179, (2010).
- 55 Yu, V. L. *et al.* Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerging infectious diseases* **13**, 986-993, (2007).
- 56 Tarkkanen, A. M. *et al.* Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infection. *Infection and immunity* **60**, 1187-1192, (1992).
- 57 Chang BJ, H. Y., Chan CH, Hsu L, Peng HL, Chang HY, Yew TR, Liu CH, Chi S. Measurement of the adhesive force between a single *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbria and collagen IV using optical tweezers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **350**, 33-38, (2006).
- 58 Hsieh, P. F., Lin, T. L., Lee, C. Z., Tsai, S. F. & Wang, J. T. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *The Journal of infectious diseases* **197**, 1717-1727, (2008).
- 59 Robin, F. *et al.* Virulence factors and TEM-type beta-lactamases produced by two isolates of an epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 1101-1104, (2012).
-

- 
- 60 Wayne, P. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. ( Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, 2014).
- 61 Salvatore, S. *et al.* Urinary tract infections in women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **156**, 131-136, (2011).
- 62 The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. <http://www.eucast.org>, (2014).
- 63 Pasteran, F., Mendez, T., Guerriero, L., Rapoport, M. & Corso, A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology* **47**, 1631-1639, (2009).
- 64 Pitout, J. D. *et al.* Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *Journal of clinical microbiology* **43**, 3129-3135, (2005).
- 65 Pitout, J. D. *et al.* beta-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**, 1350-1354, (1998).
- 66 Yan, J. J., Ko, W. C., Jung, Y. C., Chuang, C. L. & Wu, J. J. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 beta-lactamase in a university hospital in Taiwan. *Journal of clinical microbiology* **40**, 3121-3126, (2002).
- 67 Conceicao, T. *et al.* First description of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**, 477-478, (2005).
- 68 Yigit, H. *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**, 1151-1161, (2001).
- 69 Senda, K. *et al.* PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods
-

- resistant to broad-spectrum beta-lactams. *Journal of clinical microbiology* **34**, 2909-2913, (1996).
- 70 Lee, K. *et al.* bla(VIM-2) cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**, 1053-1058, (2002).
- 71 Levesque, C., Piche, L., Larose, C. & Roy, P. H. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**, 185-191, (1995).
- 72 Eckert, C. *et al.* Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**, 1249-1255, (2004).
- 73 Naas, T. *et al.* Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**, 1257-1263, (2008).
- 74 Kado, C. I. & Liu, S. T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of bacteriology* **145**, 1365-1373, (1981).
- 75 Turton, J. F., Perry, C., Elgohari, S. & Hampton, C. V. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *Journal of medical microbiology* **59**, 541-547, (2010).
- 76 Woodford, N., Turton, J. F. & Livermore, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews* **35**, 736-755, (2011).
- 77 Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P. A. & Brisse, S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of clinical microbiology* **43**, 4178-4182, (2005).
- 78 Zilberberg, M. D. S., A. F. Secular trends in gram-negative resistance among urinary tract infection hospitalizations in the United States, 2000-2009. *Infection control and hospital*

- epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* **34**, 940-946, (2013).
- 79 Sader, H. S., Flamm, R. K. & Jones, R. N. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteremia isolates in patients with urinary tract infection: results from United States and European hospitals (2009-2011). *Journal of chemotherapy*, (2013).
- 80 Bouchillon, S. K., Badal, R. E., Hoban, D. J. & Hawser, S. P. Antimicrobial susceptibility of inpatient urinary tract isolates of gram-negative bacilli in the United States: results from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART) program: 2009-2011. *Clin Ther.* **35**, 872-877, (2013).
- 81 Doenças Infecciosas: O desafio da Clínica. (Clínica Universitária de Doenças Infecciosas, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008).
- 82 Calhau, V., Boaventura, L., Ribeiro, G., Mendonca, N. & da Silva, G. J. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolated from renal transplanted patients: virulence markers, extended-spectrum beta-lactamases, and genetic relatedness. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, (2014).
- 83 Controlo de Infecções e Resistência aos Antimicrobianos em números – 2013. (Direcção-Geral da Saúde, Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos, Lisboa, Portugal, 2013).
- 84 Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012. (European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm 2014).
- 85 INFOMED. *Infarmed - Autoridade Nacional da Saúde e do Medicamento, I.P.* , <[www.infarmed.pt/infomed/](http://www.infarmed.pt/infomed/)> (
- 86 Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

- 
- 87 Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos. Report No. Norma nº 004/2013 de 21/02/2013, (Direção-Geral da Saúde, Lisboa, 2013).
- 88 Falagas, M. E., Lourida, P., Poulidakos, P., Rafailidis, P. I. & Tansarli, G. S. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, 654-663, (2014).
- 89 Frakking, F. N. *et al.* Appropriateness of empirical treatment and outcome in bacteremia caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 3092-3099, (2013).
- 90 Mushtaq, S., Woodford, N., Hope, R., Adkin, R. & Livermore, D. M. Activity of BAL30072 alone or combined with beta-lactamase inhibitors or with meropenem against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and non-fermenters. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **68**, 1601-1608, (2013).
- 91 Tacconelli, E. & Magrini, N. Global Priority List of Antibiotic-resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. *World Health Organization*, (2017).
- 92 Schultsz, C. & Geerlings, S. Plasmid-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*: changing landscape and implications for therapy. *Drugs* **72**, 1-16, (2012).
- 93 Keating, G. M. Fosfomycin trometamol: a review of its use as a single-dose oral treatment for patients with acute lower urinary tract infections and pregnant women with asymptomatic bacteriuria. *Drugs* **73**, 1951-1966, (2013).
- 94 Neuner, E. A., Sekeres, J., Hall, G. S. & van Duin, D. Experience with fosfomycin for treatment of urinary tract infections due to multidrug-resistant organisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 5744-5748, (2012).
- 95 Falagas, M. E., Kastoris, A. C., Kapaskelis, A. M. & Karageorgopoulos, D. E. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum beta-lactamase producing,
-

- Enterobacteriaceae* infections: a systematic review. *The Lancet infectious diseases* **10**, 43-50, (2010).
- 96 Michalopoulos, A. S., Livaditis, I. G. & Gougoutas, V. The revival of fosfomycin. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* **15**, e732-739, (2011).
- 97 Demir, T. & Buyukguclu, T. Evaluation of the in vitro activity of fosfomycin tromethamine against Gram-negative bacterial strains recovered from community- and hospital-acquired urinary tract infections in Turkey. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* **17**, e966-970, (2013).
- 98 Tygacil (tigecycline) - European public assessment reports (EPAR). EMA/340933/2015 (European Medicines Agency, 2015).
- 99 Peleg AY, e. a. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. . *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 128-131, (2007).
- 100 Elemam A, R. J., Mandell W. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and a brief review of the literature. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **49**, 271-274, (2009).
- 101 Rodríguez-Avil C, R.-A. I., Merino P, Picazo JJ. . *Klebsiella pneumoniae*: development of a mixed population of carbapenem and tigecycline resistance during antimicrobial therapy in a kidney transplant patient. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **18**, 61-66, (2012).
- 102 Reid GE, G. S., Aldeza CA, Janda WM, Clark NM. . Rapid development of *Acinetobacter baumannii* resistance to tigecycline. *Pharmacotherapy* **27**, 1198-1201, (2007).
- 103 Spanu, T. *et al.* In vivo emergence of tigecycline resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 4516-4518, (2012).

- 
- 104 Vading, M., Samuelsen, O., Haldorsen, B., Sundsfjord, A. S. & Giske, C. G. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **17**, 668-674, (2011).
- 105 Tsakris, A. *et al.* Comparative evaluation of combined-disk tests using different boronic acid compounds for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteriaceae clinical isolates. *Journal of clinical microbiology* **49**, 2804-2809, (2011).
- 106 Cantón, R. (ESCMID Online Lecture Library, 23rd ECCMID 2013, Berlin, Germany, 2013).
- 107 Leclercq, R. *et al.* EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **19**, 141-160, (2013).
- 108 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010).
- 109 Shibl, A. *et al.* The emergence of OXA-48- and NDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* **17**, e1130-1133, (2013).
- 110 Saidani, M., Hammami, S., Kammoun, A., Slim, A. & Boutiba-Ben Boubaker, I. Emergence of carbapenem-resistant OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Tunisia. *Journal of medical microbiology* **61**, 1746-1749, (2012).
- 111 Pfeifer, Y. *et al.* Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 2125-2128, (2012).
- 112 Bush, K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care* **14**, 224, (2010).
-



- 
- 113 Gaiarsa, S. *et al.* Genomic epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* in Italy and novel insights into the origin and global evolution of its resistance to carbapenem antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **59**, 389-396, (2015).
- 114 Matthew, M., Hedges, R. W. & Smith, J. T. Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* **138**, 657-662, (1979).
- 115 Datta, N. & Kontomichalou, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* **208**, 239-241, (1965).
- 116 Nugent, M. E. & Hedges, R. W. The nature of the genetic determinant for the SHV-1 beta-lactamase. *Mol Gen Genet* **175**, 239-243, (1979).
- 117 Livermore, D. M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews* **8**, 557-584, (1995).
- 118 Karen Bush, T. P., George Jacoby. (Lahey Clinic, <http://www.lahey.org/Studies/>, 2015).
- 119 Bradford, P. A., Cherubin, C. E., Idemyor, V., Rasmussen, B. A. & Bush, K. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago hospitals: identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing beta-lactamases in a single isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **38**, 761-766, (1994).
- 120 Quinn, J. P., Miyashiro, D., Sahm, D., Flamm, R. & Bush, K. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **33**, 1451-1456, (1989).
- 121 Rasmussen, B. A. *et al.* Genetically diverse ceftazidime-resistant isolates from a single center: biochemical and genetic characterization of TEM-10 beta-lactamases encoded by different nucleotide sequences. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **37**, 1989-1992, (1993).
- 122 Barroso, H. *et al.* Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-
-

- lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **45**, 611-616, (2000).
- 123 Mahrouki, S. *et al.* Nosocomial dissemination of plasmids carrying blaTEM-24, blaDHA-1, aac(6')-Ib-cr, and qnrA6 in *Providencia* spp. strains isolated from a Tunisian hospital. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **81**, 50-52, (2015).
- 124 Novais, A. *et al.* International spread and persistence of TEM-24 is caused by the confluence of highly penetrating *enterobacteriaceae* clones and an IncA/C2 plasmid containing Tn1696::Tn1 and IS5075-Tn21. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 825-834, (2010).
- 125 Hibbert-Rogers, L. C. *et al.* Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology ward. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **36**, 65-82, (1995).
- 126 Bauernfeind, A., Grimm, H. & Schweighart, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* **18**, 294-298, (1990).
- 127 Lohr, I. H. *et al.* Persistence of a pKPN3-like CTX-M-15-encoding IncFIIK plasmid in a *Klebsiella pneumoniae* ST17 host during two years of intestinal colonization. *PloS one* **10**, e0116516, (2015).
- 128 Mathers, A. J., Peirano, G. & Pitout, J. D. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clinical microbiology reviews* **28**, 565-591, (2015).
- 129 Rodriguez-Villalobos, H. & Glupczynski, Y. Emergence and dissemination of multi-resistant Gram negative *Enterobacteriaceae*: lessons to be learnt from local and national surveillance programs in Belgium. *Acta Clin Belg* **70**, 1-10, (2015).
- 130 Shahraki-Zahedani, S., Moghadampour, M., Bokaeian, M. & Ansari-Moghaddam, A. Prevalence of CTX-M-8 and CTX-M-15 type extended-spectrum beta-lactamases between *Klebsiella*

- pneumoniae* spp. isolated from Zahedan, Southeast Iran. *Journal of chemotherapy*, (2015).
- 131 Lautenbach, E., Patel, J. B., Bilker, W. B., Edelstein, P. H. & Fishman, N. O. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **32**, 1162-1171, (2001).
  - 132 Nordmann, P., Cuzon, G. & Naas, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases* **9**, 228-236, (2009).
  - 133 Pulcrano, G. *et al.* Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST512 carrying blaKPC-3 in a hospital in southern Italy. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **122**, 42-46, (2014).
  - 134 Kocsis, E., Lo Cascio, G., Piccoli, M., Cornaglia, G. & Mazzariol, A. KPC-3 Carbapenemase Harbored in FIIk Plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST512 and *Escherichia coli* ST43 in the Same Patient. *Microbial drug resistance*, (2014).
  - 135 Villa, L. *et al.* Reversion to susceptibility of a carbapenem-resistant clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **68**, 2482-2486, (2013).
  - 136 Rodriguez-Zulueta, P. *et al.* First outbreak of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) clinical isolates in a Mexican Medical Center. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 4086-4088, (2013).
  - 137 Perilli, M. *et al.* Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* harbouring blaKPC-3 and blaVIM-2 from central Italy. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **75**, 218-221, (2013).
  - 138 Di Carlo, P. *et al.* KPC - 3 *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone infection in postoperative abdominal surgery patients in an intensive care setting: analysis of a case series of 30 patients. *BMC anesthesiology* **13**, 13, (2013).
  - 139 Robustillo Rodela, A. *et al.* Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3

- Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: control measures. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **17**, (2012).
- 140 Leavitt, A., Chmelnitsky, I., Carmeli, Y. & Navon-Venezia, S. Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 4493-4496, (2010).
- 141 Le, J. *et al.* Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase KPC-3 in Long Beach, California. *Journal of clinical microbiology* **48**, 623-625, (2010).
- 142 Cuzon, G., Naas, T., Demachy, M. C. & Nordmann, P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**, 796-797, (2008).
- 143 Bush, K. Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Microbiol* **13**, 558-564, (2010).
- 144 Machado, P., Silva, A., Lito, L., Melo-Cristino, J., Duarte, A. . Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST-11 producing KPC-3 carbapenemase at a Lisbon hospital. **16**, (2010).
- 145 Kocsis, E., Lo Cascio, G., Piccoli, M., Cornaglia, G. & Mazzariol, A. KPC-3 carbapenemase harbored in FIIk plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST512 and *Escherichia coli* ST43 in the same patient. *Microbial drug resistance* **20**, 377-382, (2014).
- 146 Lopez-Cerero, L. *et al.* Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST512) in Spain. *International journal of antimicrobial agents* **44**, 538-540, (2014).
- 147 Mezzatesta, M. L. *et al.* Carbapenem and multidrug resistance in Gram-negative bacteria in a single centre in Italy: considerations on in vitro assay of active drugs. *International journal of antimicrobial agents* **44**, 112-116, (2014).

- 
- 148 Oliveira, S. *et al.* Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **69**, 849-852, (2014).
- 149 Ducomble, T. *et al.* Large hospital outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*: investigating mortality and the impact of screening for KPC-2 with polymerase chain reaction. *The Journal of hospital infection* **89**, 179-185, (2015).
- 150 Geraci, D. M. *et al.* Is the monoclonal spread of the ST258, KPC-3-producing clone being replaced in southern Italy by the dissemination of multiple clones of carbapenem-nonsusceptible, KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae*? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **21**, e15-17, (2015).
- 151 Wang, D., Chen, J., Yang, L., Mou, Y. & Yang, Y. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the KPC variants, KPC-2 and its recently discovered variant KPC-15. *PloS one* **9**, e111491, (2014).
- 152 Wang, D. *et al.* Characterisation of the blaKPC-2 and blaKPC-3 genes and the novel blaKPC-15 gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of medical microbiology*, (2014).
- 153 Yu, W. L. *et al.* Emergence of KPC new variants (KPC-16 and KPC-17) and ongoing outbreak in southern Taiwan. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **21**, 347 e345-348, (2015).
- 154 Caneiras, C., Calisto, F.; Da Silva, G.; Lito, L.; Melo Cristino, J.; Duarte, A.(European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2012).
- 155 Datta, S., Mitra, S., Viswanathan, R., Saha, A. & Basu, S. Characterization of novel plasmid-mediated beta-lactamases (SHV-167 and ACT-16) associated with New Delhi metallo-beta-lactamase-1 harbouring isolates from neonates in India. *Journal of medical microbiology* **63**, 480-482, (2014).
- 156 Dash, N. *et al.* High incidence of New Delhi metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella*
-

- pneumoniae* isolates in Sharjah, United Arab Emirates. *Microbial drug resistance* **20**, 52-56, (2014).
- 157 Diestra, K. *et al.* Characterization of plasmids encoding *bla*ESBL and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **63**, 60-66, (2009).
- 158 Compain, F. *et al.* Targeting relaxase genes for classification of the predominant plasmids in *Enterobacteriaceae*. *International journal of medical microbiology : IJMM* **304**, 236-242, (2014).
- 159 Villa, L., Garcia-Fernandez, A., Fortini, D. & Carattoli, A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **65**, 2518-2529, (2010).
- 160 Peirano, G., Lascols, C., Hackel, M., Hoban, D. J. & Pitout, J. D. Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* that produce VIMs and IMPs from the SMART surveillance program. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **78**, 277-281, (2014).
- 161 Perez-Chaparro, P. J. *et al.* Complete Nucleotide Sequences of Two *bla*KPC-2-Bearing IncN Plasmids Isolated from Sequence Type 442 *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains Four Years Apart. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, 2958-2960, (2014).
- 162 Carattoli, A. Plasmids and the spread of resistance. *International journal of medical microbiology : IJMM* **303**, 298-304, (2013).
- 163 Lopez-Camacho, E. *et al.* Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **69**, 632-636, (2014).
- 164 Peirano, G., Ahmed-Bentley, J., Fuller, J., Rubin, J. E. & Pitout, J. D. Travel-related carbapenemase-producing gram-negative bacteria in alberta, Canada: the first 3 years. *Journal of clinical microbiology* **52**, 1575-1581, (2014).

- 
- 165 Mataseje, L. F. *et al.* Complete sequences of a novel bla<sub>NDM-1</sub>-harbouring plasmid from *Providencia rettgeri* and an FII-type plasmid from *Klebsiella pneumoniae* identified in Canada. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **69**, 637-642, (2014).
- 166 Calisto, F. *Emergência de carbapenemases em Klebsiella pneumoniae: o desafio de bactérias multirresistentes e virulentas*, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, (2011).
- 167 Dexi Bi , X. J., Zi-Ke Sheng , David Ngmenterebo , Cui Tai , Minggu Wang , Zixin Deng, Kumar Rajakumar, Hong-Yu Ou. Mapping the resistance-associated mobilome of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain reveals insights into factors shaping these regions and facilitates generation of a 'resistance-disarmed' model organism. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **70**, 2770 - 2774 ( 2015).
- 168 Curiao, T. *et al.* Emergence of bla<sub>KPC-3-Tn4401a</sub> associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **65**, 1608-1614, (2010).
- 169 Shen, P. *et al.* Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among *Enterobacteriaceae* in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**, 4333-4338, (2009).
- 170 Ruiz-Garbajosa, P. *et al.* Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **68**, 2487-2492, (2013).
- 171 Pastrana-Carrasco, J. *et al.* [QacEdelta1 gene frequency and biocide resistance in extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae clinical isolates]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion* **64**, 535-540, (2012).
- 172 Roy Chowdhury, P. *et al.* Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in
-

- Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 3140-3149, (2011).
- 173 Sun, J. *et al.* Class 1 integrons in urinary isolates of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Southern China during the past five years. *Microbial drug resistance* **19**, 289-294, (2013).
- 174 Haldorsen, B. C., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A., Samuelsen, O. & Norwegian Study Group on Aminoglycoside, R. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **78**, 66-69, (2014).
- 175 Kumar, A., Chakraborti, S., Joshi, P., Chakrabarti, P. & Chakraborty, R. A multiple antibiotic and serum resistant oligotrophic strain, *Klebsiella pneumoniae* MB45 having novel dfrA30, is sensitive to ZnO QDs. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* **10**, 19, (2011).
- 176 Chakraborty, R. *et al.* Diverse gene cassettes in class 1 integrons of facultative oligotrophic bacteria of River Mahananda, West Bengal, India. *PloS one* **8**, e71753, (2013).
- 177 Alcantar-Curiel, M. D. *et al.* Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence* **4**, 129-138, (2013).
- 178 Stahlhut, S. G. *et al.* Structural and population characterization of MrkD, the adhesive subunit of type 3 fimbriae. *Journal of bacteriology* **195**, 5602-5613, (2013).
- 179 Pan, Y. J. *et al.* Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. *Journal of clinical microbiology* **46**, 2231-2240, (2008).
- 180 Fung, C. P. & Siu, L. K. Virulence of *Klebsiella pneumoniae* serotype K2 should not be underestimated in K. pneumoniae liver abscess. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **45**, 1530-1531; author reply 1532-1533, (2007).



- 
- 181 Ito, R. *et al.* Molecular epidemiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* associated with bacteremia among patients with pneumonia. *Journal of clinical microbiology* **53**, 879-886, (2015).
- 182 Bialek-Davenet, S. *et al.* Development of a multiplex PCR assay for identification of *Klebsiella pneumoniae* hypervirulent clones of capsular serotype K2. *Journal of medical microbiology* **63**, 1608-1614, (2014).
- 183 Murphy, C. N., Mortensen, M. S., Krogfelt, K. A. & Clegg, S. Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. *Infection and immunity* **81**, 3009-3017, (2013).
- 184 Parasion, S., Kwiatek, M., Gryko, R., Mizak, L. & Malm, A. Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists* **63**, 137-145, (2014).
- 185 Stahlhut, S. G., Struve, C., Krogfelt, K. A. & Reisner, A. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS immunology and medical microbiology* **65**, 350-359, (2012).
- 186 Siu, L. K., Huang, D. B. & Chiang, T. Plasmid transferability of KPC into a virulent K2 serotype *Klebsiella pneumoniae*. *BMC infectious diseases* **14**, 176, (2014).
- 187 Shin, J. & Ko, K. S. Comparative study of genotype and virulence in CTX-M-producing and non-extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, 2463-2467, (2014).
- 188 Tzouvelekis, L. S. *et al.* KPC-producing, multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 as a typical opportunistic pathogen. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 5144-5146, (2013).
- 189 Li, W. *et al.* Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Clinical infectious diseases : an official publication of the*
-

- 
- Infectious Diseases Society of America* **58**, 225-232, (2014).
- 190 Russo, T. A. *et al.* Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than "classical" *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence. *PloS one* **6**, e26734, (2011).
- 191 Shon, A. S., Bajwa, R. P. & Russo, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence* **4**, 107-118, (2013).
- 192 Russo, T. A. *et al.* Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity* **82**, 2356-2367, (2014).
- 193 El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S. & Bakour, R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie-biologie* **61**, 209-216, (2013).
- 194 McLaughlin, M. M. *et al.* Quantifying the clinical virulence of *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemase *Klebsiella pneumoniae* with a *Galleria mellonella* model and a pilot study to translate to patient outcomes. *BMC infectious diseases* **14**, 31, (2014).
- 195 Holt, K. E. *et al.* Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E3574-3581, (2015).
- 196 Nielsen, J. B. *et al.* Identification of CTX-M15-, SHV-28-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 as an epidemic clone in the Copenhagen area using a semi-automated Rep-PCR typing assay. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **30**, 773-778, (2011).
- 197 Damjanova, I. *et al.* Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*
-

- 
- epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **62**, 978-985, (2008).
- 198 Quinones, D. *et al.* High clonal diversity in a non-outbreak situation of clinical ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the first national surveillance program in Cuba. *Microbial drug resistance* **20**, 45-51, (2014).
- 199 Alouache, S. *et al.* Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microbial drug resistance* **20**, 30-38, (2014).
- 200 Andrade, L. N. *et al.* Expansion and Evolution of a Virulent, Extensively Drug-Resistant (Polymyxin B-Resistant), QnrS1-, CTX-M-2- and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 International High-risk Clone. *Journal of clinical microbiology*, (2014).
- 201 Tang, Y., Shen, P., Liang, W., Jin, J. & Jiang, X. A putative multi-replicon plasmid co-harboring beta-lactamase genes *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> and *bla*<sub>TEM-1</sub> and trimethoprim resistance gene *dfrA25* from a *Klebsiella pneumoniae* sequence type (ST) 11 strain in China. *PloS one* **12**, e0171339, (2017).
- 202 Ko, K. S. *et al.* Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *Journal of medical microbiology* **59**, 822-828, (2010).
- 203 Ramos, P. I. *et al.* Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC genomics* **15**, 54, (2014).
- 204 Chen, L. *et al.* Comparative Genomic Analysis of KPC-Encoding pKpQIL-Like Plasmids and Their Distribution in New Jersey and New York Hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, 2871-2877, (2014).
-

- 
- 205 Rodrigues, C., Novais, A., Machado, E. & Peixe, L. Detection of VIM-34, a novel VIM-1 variant identified in the intercontinental ST15 *Klebsiella pneumoniae* clone. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **69**, 274-275, (2014).
- 206 Hrabak, J. *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Czech Republic in 2011. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **18**, 20626, (2013).
- 207 Shoma, S., Kamruzzaman, M., Ginn, A. N., Iredell, J. R. & Partridge, S. R. Characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Australia carrying blaNDM-1. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **78**, 93-97, (2014).
- 208 Wang, X. *et al.* An outbreak of a nosocomial NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 at a teaching hospital in mainland China. *Microbial drug resistance* **20**, 144-149, (2014).
- 209 Liu, Y. *et al.* First description of NDM-1-, KPC-2-, VIM-2- and IMP-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a single Chinese teaching hospital. *Epidemiology and infection*, 1-9, (2014).
- 210 Poirel, L., Al Maskari, Z., Al Rashdi, F., Bernabeu, S. & Nordmann, P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **66**, 304-306, (2011).
- 211 Giske, C. G. *et al.* Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of blaNDM-1 in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 2735-2738, (2012).
- 212 Qin, S. *et al.* High incidence and endemic spread of NDM-1 positive *Enterobacteriaceae* in Henan province, China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, (2014).
- 213 Jiang, Y. *et al.* Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying bla<sub>KPC-2</sub>, bla<sub>DHA-1</sub>, qnrB4, and armA. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 3967-3969, (2010).
-

- 
- 214 Kuai, S. *et al.* KPC-2 carbapenemase and DHA-1 AmpC determinants carried on the same plasmid in *Enterobacter aerogenes*. *Journal of medical microbiology* **63**, 367-370, (2014).
- 215 Leavitt, A., Chmelnitsky, I., Ofek, I., Carmeli, Y. & Navon-Venezia, S. Plasmid pKpQIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **65**, 243-248, (2010).
- 216 Chen, L. *et al.* Complete sequence of a bla(KPC-2)-harboring IncFII(K1) plasmid from a *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 1542-1545, (2013).
- 217 Mathers, A. J., Peirano, G. & Pitout, J. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clinical microbiology reviews* **28**, 565-591, (2015).
- 218 Hsueh, P. R. *et al.* Consensus review of the epidemiology and appropriate antimicrobial therapy of complicated urinary tract infections in Asia-Pacific region. *The Journal of infection* **63**, 114-123, (2011).
- 219 Keynan, Y. & Rubinstein, E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. *International journal of antimicrobial agents* **30**, 385-389, (2007).
- 220 A. Narciso, A. E., F. Fonseca, A. Duarte. Infecções urinárias na comunidade: estudo multicêntrico. *Revista Portuguesa Doenças Infecciosas* **8**, 7-12, (2012).
- 221 Passadouro, R., Fonseca, R., Figueiredo, F., Lopes, A. & Fernandes, C. Evaluation of the antimicrobial susceptibility of community-acquired urinary tract infection. *Acta Med Port* **27**, 737-742, (2014).
- 222 Yolbas, I. *et al.* Community-acquired urinary tract infections in children: pathogens, antibiotic susceptibility and seasonal changes. *European review for medical and pharmacological sciences* **17**, 971-976, (2013).
-

- 
- 223 Kamenski, G. *et al.* Antibacterial resistances in uncomplicated urinary tract infections in women: ECO.SENS II data from primary health care in Austria. *BMC infectious diseases* **12**, 222, (2012).
- 224 Katsarolis, I. *et al.* Acute uncomplicated cystitis: from surveillance data to a rationale for empirical treatment. *International journal of antimicrobial agents* **35**, 62-67, (2010).
- 225 Lee, S. S., Kim, Y. & Chung, D. R. Impact of discordant empirical therapy on outcome of community-acquired bacteremic acute pyelonephritis. *The Journal of infection* **62**, 159-164, (2011).
- 226 Koningstein, M. *et al.* Recommendations for the empirical treatment of complicated urinary tract infections using surveillance data on antimicrobial resistance in the Netherlands. *PLoS one* **9**, e86634, (2014).
- 227 De Francesco, M. A., Ravizzola, G., Peroni, L., Negrini, R. & Manca, N. Urinary tract infections in Brescia, Italy: etiology of uropathogens and antimicrobial resistance of common uropathogens. *Med Sci Monit* **13**, BR136-144, (2007).
- 228 Correia, C. *et al.* Etiology of urinary tract infections and antimicrobial susceptibility of urinary pathogens. *Acta Med Port* **20**, 543-550, (2007).
- 229 Martins, F., Vitorino, J. & Abreu, A. Evaluation of the antimicrobial susceptibility profile of microorganisms isolated from urine in the region of Vale do Sousa and Tamega. *Acta Med Port* **23**, 641-646, (2010).
- 230 Linhares, I., Raposo, T., Rodrigues, A. & Almeida, A. Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000-2009). *BMC infectious diseases* **13**, 19, (2013).
- 231 Neidell, M. J. *et al.* Costs of healthcare- and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **55**, 807-815, (2012).
-

- 
- 232 Pereira, S. G., Marques, M., Pereira, J. & Cardoso, O. Multidrug and extensive drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Portuguese central hospital: 10-year survey. *Microbial drug resistance* **21**, 194-200, (2015).
- 233 Saltoglu, N. *et al.* Comparison of community-onset healthcare-associated and hospital-acquired urinary infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and antimicrobial activities. *Int J Clin Pract*, (2015).
- 234 Meier, S., Weber, R., Zbinden, R., Ruef, C. & Hasse, B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Gram-negative pathogens in community-acquired urinary tract infections: an increasing challenge for antimicrobial therapy. *Infection* **39**, 333-340, (2011).
- 235 Pignanelli, S. *et al.* In vitro antimicrobial activity of several antimicrobial agents against *Escherichia coli* isolated from community-acquired uncomplicated urinary tract infections. *European review for medical and pharmacological sciences* **17**, 206-209, (2013).
- 236 Sanchez, G. V., Baird, A. M., Karlowsky, J. A., Master, R. N. & Bordon, J. M. Nitrofurantoin retains antimicrobial activity against multidrug-resistant urinary *Escherichia coli* from US outpatients. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **69**, 3259-3262, (2014).
- 237 Gupta, K. *et al.* International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **52**, e103-120, (2011).
- 238 Terapêutica de infeções do aparelho urinário (comunidade). (Direcção Geral da Saúde (DGS), Lisboa 2011).
- 239 Fihn, S. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. *New Engl J Med* **349**, 259-266, (2003).
-

- 
- 240 De Sousa, J. C. *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. (Universidade Fernando Pessoa, 2005).
- 241 Garau, J. Other antimicrobials of interest in the era of extended-spectrum beta-lactamases: fosfomycin, nitrofurantoin and tigecycline. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **14 Suppl 1**, 198-202, (2008).
- 242 Mandell GL, B. J., Dolin R. . *Principles and practice of infectious diseases*. 6th edn. edn, (Elsevier, 2005).
- 243 Cho, Y. H. *et al.* Antimicrobial susceptibilities of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in health care-associated urinary tract infection: focus on susceptibility to fosfomycin. *Int Urol Nephrol*, (2015).
- 244 Rodríguez López FC, F.-A. d. L. F., Gordillo Urbano RM, Ibarra González A, Casal Román M. Microorganisms isolated from outpatient urine samples and antimicrobial susceptibility over a 12-year period. *Rev Esp Quimioter* **18**, 159-167, (2005).
- 245 A. Ródenas, V. D. d. B., E. Rovira, A. Foix, A. González, A. Capellà, E. Bragulat. (Revista Clínica Española, Sociedad Española de Medicina Interna, XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI), IV Congreso Ibérico de Medicina Interna, II Congreso de la Sociedad de Medicina Interna de la Región de Murcia, 2014).
- 246 Tumbarello, M. *et al.* Identifying patients harboring extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* on hospital admission: derivation and validation of a scoring system. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 3485-3490, (2011).
- 247 O'Brien, T. F. & Stelling, J. Integrated Multilevel Surveillance of the World's Infecting Microbes and Their Resistance to Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology reviews* **24**, 281-295, (2011).
- 248 Masterton, R. The importance and future of antimicrobial surveillance studies. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **47 Suppl 1**, S21-31,
-



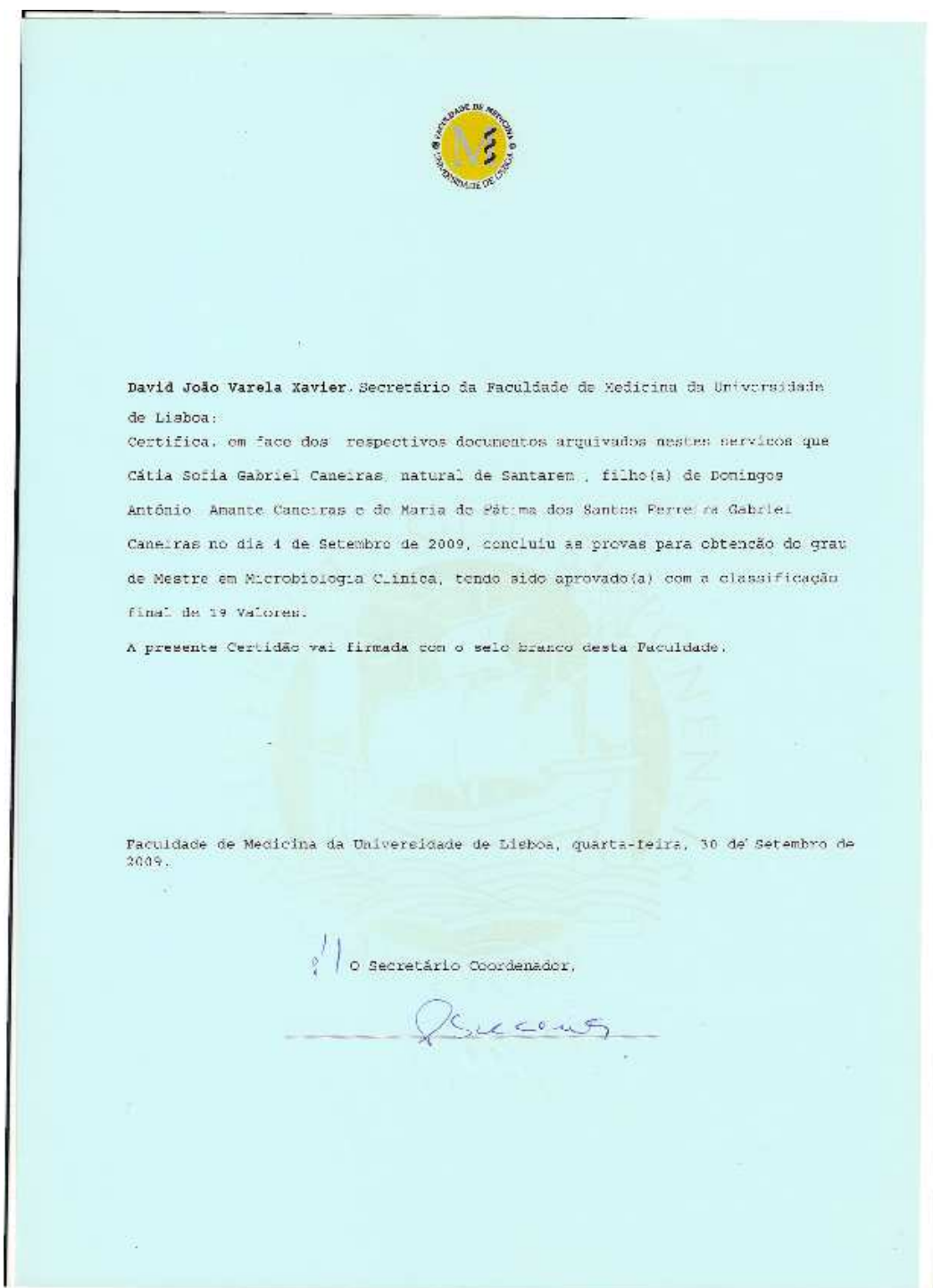
- (2008).
- 249 Isabel RAMALHINHO, M. R., Isaura VIEIRA, José CABRITA. A Evolução do Consumo de Antibióticos em Ambulatório em Portugal Continental 2000-2009. *Acta Med Port* **25**, 20-28, (2012).
  - 250 ATC/DDD Index 2015. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. (World Health Organization, [http://www.whocc.no/atc\\_ddd\\_index/](http://www.whocc.no/atc_ddd_index/), 2015).
  - 251 MacVane, S. H., Tuttle, L. O. & Nicolau, D. P. Impact of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms on clinical and economic outcomes in patients with urinary tract infection. *Journal of hospital medicine : an official publication of the Society of Hospital Medicine* **9**, 232-238, (2014).
  - 252 Jacoby, G. A. AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews* **22**, 161-182, Table of Contents, (2009).
  - 253 Pai H, K. C., Byeon JH, Lee KD, Park WB, Kim HB, et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48**, 3720-3728 (2004).
  - 254 Hassan, M. I. et al. Detection of extended spectrum beta-lactamases-producing isolates and effect of AmpC overlapping. *J Infect Dev Ctries* **7**, 618-629, (2013).
  - 255 Miro, E. et al. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC beta-lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **32**, 253-259, (2013).
  - 256 Knudsen, J. D., Andersen, S. E. & Bispebjerg Intervention, G. A multidisciplinary intervention to reduce infections of ESBL- and AmpC-producing, gram-negative bacteria at a University Hospital. *PloS one* **9**, e86457, (2014).
  - 257 Kung, C. H. et al. Epidemiology and risk factors of community-onset urinary tract infection caused

- by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a medical center in Taiwan: a prospective cohort study. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* **48**, 168-174, (2015).
- 258 Lee, J. A. *et al.* Epidemiology and clinical features of community-onset bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial drug resistance* **17**, 267-273, (2011).
- 259 Nakamura, T. *et al.* Susceptibility of various oral antibacterial agents against extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* **20**, 48-51, (2014).
- 260 Lin, W. H. *et al.* Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates causing community-acquired urinary tract infections. *Infection* **38**, 459-464, (2010).
- 261 Sanchez, C. J., Jr. *et al.* Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC infectious diseases* **13**, 47, (2013).
- 262 Struve, C., Bojer, M. & Krogfelt, K. A. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infection and immunity* **77**, 5016-5024, (2009).

## VI. ANEXOS



## ANEXO 1. Provas Microbiologia Clínica





## ANEXO 2. Assentimento da FMUL à Tese de Doutoramento



Exma. Senhora  
Dra. Cátia Sofia Gabriel Caneiras

*Conselho Científico*

CC - 308  
17 de Dezembro de 2009

O Conselho Científico na sua Reunião de 15 de Dezembro de 2009, deu o seu assentimento ao trabalho que se propõe realizar conducente à Dissertação de Doutoramento em Ciências e Tecnologias da Saúde (Microbiologia) subordinado ao título ***"Epidemiologia molecular e estudo dos determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Klebsiella spp*"***, sob a orientação dos Professores Doutores Aida Duarte e J. Melo Cristino. Será também necessário obter a aprovação da Comissão de Ética da FMUL.

Gostaríamos que durante o próximo ano nos informasse de forma circunstanciada do progresso da sua investigação.

Com os meus melhores cumprimentos,


Prof. Doutor Rui M. M. Victorino  
**PRESIDENTE DO CONSELHO CIENTÍFICO**





### ANEXO 3. Parecer Favorável da Comissão de Ética da FMUL

FACULDADE DE MEDICINA  
DA UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Comissão de Ética



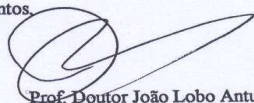
Exma Senhora  
Dr.ª Cátia Caneiras  
Praceta Gil Eanes 3, 6º A  
2660-444 Stº António dos Cavaleiros

**Assunto:** Parecer da Comissão de Ética da FMUL  
**Data:** 17 de Fevereiro de 2011

A Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, na reunião do dia 16 de Fevereiro de 2011, analisou o projecto “Epidemiologia molecular e estudo dos determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Klebsiella spp*” submetido por Vª Ex.ª

Foi dado parecer favorável à realização do estudo.

Com os nossos melhores cumprimentos,

  
Prof. Doutor João Lobo Antunes  
Presidente da Comissão de Ética  
da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

---

A/C: Conselho Científico, fax 217985114 ou Centro de Bioética, Secretariado, tel. 217985182, e-mail: [cbioetica@fm.ul.pt](mailto:cbioetica@fm.ul.pt),  
Faculdade de Medicina de Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa



## ANEXO 4. Parecer Orientadora



### Parecer

Para efeitos de submissão ao Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, do pedido de apreciação da tese conducente ao Grau de Doutor em Microbiologia da Mestre Cátia Sofia Gabriel Caneiras, e na qualidade de orientadora venho emitir o presente parecer.

Em 2005-2007, nos últimos anos da Licenciatura em Ciências Farmacêuticas na Faculdade de Farmácia, a Cátia manifestou interesse em estudar e compreender a Bacteriologia Clínica, a necessidade em aprofundar os conhecimentos na área da Microbiologia, levou-a a ingressar no Mestrado em Microbiologia Clínica da Faculdade de Medicina, da Universidade de Lisboa. Em Setembro de 2009 defendeu a sua dissertação de Mestrado sobre: "Bacterémias: determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.*", com a classificação final de 19 valores. Este estudo foi de extrema relevância, na medida em que o conhecimento de como as bactérias colonizam e permanecem no hospedeiro permitiu demonstrar, para além da resistência aos antibióticos, a capacidade que as bactérias potencialmente patogénicas têm em colonizar o hospedeiro e permanecer nele durante anos. Esta característica foi demonstrada em estirpes de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* multirresistentes produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs), isoladas entre 2000-2007 no Hospital de Santa Maria.

Sabendo da existência de uma colecção de bactérias isoladas no Hospital de Santa Maria, entre 1980 e 2010, uma vez mais a Cátia manifestou interesse em aprofundar os seus conhecimentos. Para tal, propôs um estudo que completasse o trabalho realizado durante o Mestrado, conhecer o comportamento de bactérias isoladas antes e após a data da emergência de bactérias produtoras de ESBLs, tendo sido seleccionadas estirpes de *Klebsiella spp.* isoladas durante 30 anos no Hospital de Santa Maria. Efectivamente, o tema proposto "Epidemiologia molecular e estudo dos determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Klebsiella spp.*" teve como base estirpes isoladas em dois períodos distintos, pré e pós a introdução na terapêutica das cefalosporinas de terceira e quarta

Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa. Av. Prof. Gama Pinto 1649-003 Lisboa – Portugal  
Tel: +351 217 946 400 Fax: +351 217 946 470



geração e das fluorquinolonas. As bactérias do 1º grupo (1980-1989) tinham sido caracterizadas por métodos fenotípicos, mas nada se sabia da caracterização genética, enquanto as do 2º grupo (1990-2008), produtoras de ESBLs, uma parte já caracterizada no Mestrado e faltava completar a componente genética. As restantes do 3º grupo (2009-2010) correspondem ao período da emergência de estirpes produtoras de carbapenemases.

O trabalho laboratorial desenvolveu-se principalmente em quatro fases: na primeira (2009-2010) foi efectuado i) o estudo da susceptibilidade aos antibióticos tendo como base um antibiograma padrão, igual para todas as estirpes em estudo e a ii) caracterização genómica e identificação dos principais determinantes genéticos de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

Na segunda fase (2010 e 2011) foram estudados os determinantes de resistência e de virulência dos isolados produtores de carbapenemases, referentes ao último período do estudo.

Na terceira fase foi efectuada a caracterização dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* responsáveis por infecções urinárias na comunidade. A comparação dos isolados da comunidade com os isolados provenientes do meio hospitalar permitiu conhecer a evolução desta espécie bacteriana nos dois ambientes, reforçando a importância de implementar medidas de controlo da infecção, de modo a impedir a emergência e a disseminação de estirpes multiresistentes e virulentas, quer no ambiente hospitalar quer na comunidade. Tema extremamente actual e de grande importância, que levou a Organização Mundial de Saúde a publicar em 27 de Fevereiro de 2017, pela primeira vez, uma lista de microrganismos resistentes aos antibióticos considerados prioritários para estudos de novos antibióticos, na qual a *Klebsiella* é considerada um patógeno de prioridade crítica.

Na quarta fase finalizou-se a detecção dos principais genes de virulência nos isolados em estudo. A caracterização genética dos determinantes de resistência e virulência foi completada com a confirmação por sequenciação e análises das sequências.

O trabalho experimental que a Cátia efectuou no Laboratório de Investigação em Microbiologia, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, permitiu concretizar os objectivos propostos no projecto de tese "Epidemiologia molecular e estudo dos determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Klebsiella* spp."



A Cátia tem demonstrado uma elevada maturidade, tem revelado uma constante procura de actualização de conhecimentos, uma enorme capacidade de trabalho, uma facilidade de comunicação e de transmitir os conhecimentos adquiridos.

A sua perseverança, a capacidade crítica em analisar os resultados permitiu-lhe a elaboração do trabalho final e em simultâneo a preparação de comunicações orais e em formato de painel a apresentar em congressos nacionais e internacionais, assim como a elaboração de manuscritos submetidos a jornais nacionais e internacionais.

Gostaria de realçar que a Cátia tem de conciliar a sua vida pessoal (maternidade) com a carreira profissional, o que não lhe permite a dedicação em exclusividade ao seu trabalho de investigação, implicando um esforço enorme da sua parte, com a ocupação de férias e de fins de semana.

Por tudo o que foi descrito, atendendo às suas qualidades intelectuais e pessoais, pensamos que nos encontramos perante uma pessoa com elevado potencial, associado à vocação para a investigação científica o que justifica plenamente a aceitação do seu trabalho para a obtenção do Grau de Doutor

Lisboa, 14 de Fevereiro de 2018

Aida Duarte  
Professora Associada com Agregação  
Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa



## ANEXO 4. Parecer Co-Orientador



Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina

*Grande Oficial da Ordem de S. Tiago de Espada*

Instituto de Microbiologia

(Director: Prof. Doutor J. Melo Cristino)

### Declaração

Para os devidos efeitos declaro que a proposta de dissertação de doutoramento da Licenciada Cátia Caneiras intitulada **Epidemiologia molecular e estudo dos determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Klebsiella* spp.**, de que sou co-orientador, pode ser submetida à apreciação do Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. A licenciada Cátia Caneiras aguarda ainda a aceitação de um manuscrito contendo material da dissertação mas, de acordo com as últimas orientações do Conselho Científico, pode ser desencadeado o pedido de *imprimatur*.

FMUL, 20 de Março de 2018-03-20

Prof. J. Melo Cristino  
Co-Orientador





## ANEXO 4. Parecer da Direcção Médica Ibérica da entidade empregadora (original)



### Declaración

Yo, **Sagrario Mayoralas Alises**, Licenciada y Doctorada en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid, me dirijo a ustedes por medio del presente documento para poner en valor la necesidad de mantener en las empresas, especialmente en aquellas relacionadas con el ámbito de la salud, personas de valía con intereses en la investigación traslacional que permitan desarrollar nuevos proyectos relacionados con el ámbito de dicha empresa, aportando al mundo empresarial nuevos enfoques de los problemas y sus eventuales soluciones. El conocimiento y desarrollo del método científico aporta una valía indiscutible en cualquier ámbito laboral, que en el caso de nuestra empresa, en contacto directo con los pacientes, es especialmente importante. Me gustaría resaltar la impresionante labor que realiza **Cátia Sofia Gabriel Caneiras** en su desarrollo científico y profesional, aparte de su inagotable capacidad de trabajo y compromiso. Para la Dirección Médica de Praxair Iberia su empuje y conocimiento son imprescindibles para conseguir que los proyectos sean desarrollados con la rigurosidad científica necesaria. Es por ello, que desde Praxair, damos todo el apoyo necesario para que pueda completar su Doctorado en Ciencias y Tecnologías de Salud por la Facultad de Medicina de la Universidad de Lisboa.

6 de Febrero de 2018

Dra. Sagrario Mayoralas Alises

Directora Médico Praxair Iberia

## **ANEXO 5. Parecer da Direcção Médica Ibérica da entidade empregadora (tradução livre)**

### **Declaração**

Eu, Sagrario Mayoralas Alises, Licenciada e Doutorada em Medicina e Cirurgia pela Universidade Autónoma de Madrid, dirijo-me a Vossas Excelências através do presente documento para colocar em valor a necessidade de manter nas empresas, especialmente naquelas relacionadas com o âmbito da Saúde, pessoas de valor com interesse na investigação translaccional que permitam desenvolver novos projectos relacionados com o âmbito de actuação da empresa, aportando ao mundo empresarial novas visões dos problemas e suas eventuais soluções. O conhecimento e desenvolvimento do método científico aporta uma mais valia indiscutível em qualquer âmbito laboral, que no caso da nossa empresa, que estabelece contacto directo com os doentes, é especialmente importante. Gostaria de realçar o impressionante trabalho que realiza Cátia Sofia Gabriel Caneiras no seu desenvolvimento científico e profissional, à parte da sua inesgotável capacidade de trabalho e compromisso. Para a Direcção Médica da Praxair Ibérica a sua força e conhecimento são imprescindíveis para conseguir que os projectos sejam desenvolvidos com o rigor científico necessário. E é por isso que, da Praxair, damos todo o apoio necessário para que possa completar o seu Doutoramento em Ciências e Tecnologias da Saúde pela Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

[Assinatura]

6 de Fevereiro de 2018

Dra. Sagrario Mayoralas Alises

Directora Médica da Praxair Ibérica

Título: **Epidemiologia molecular e estudo dos determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Klebsiella* spp.**

Autor: Cátia Sofia Gabriel Caneiras

Edição: Do Autor

ISBN: 978-989-20-9174-7

Ano: 2019